

Chlorophyllid *a* Oxidoreduktase

aus *Roseobacter denitrificans*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Svenja Kiesel

aus Bad Mergentheim

1. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn
2. Referentin: Professorin Dr. Susanne Engelmann
eingereicht am: 08.07.2015
mündliche Prüfung (Disputation) am: 01.02.2016

Druckjahr 2016

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikation

Kiesel, S., Wätzlich, D., Lange, C., Reijerse, E., Bröcker, M.J., Rüdiger, W., Lubitz, W., Scheer, H., Moser, J. and Jahn, D. Iron-Sulfur Cluster-dependent Catalysis of Chlorophyllide *a* Oxidoreductase from *Roseobacter denitrificans*. J Biol Chem 290: 1141-1154 (2015).

Tagungsbeiträge

Kiesel, S., Lange, C., Wätzlich, D., Virus, S., Rüdiger, W., Scheer, H., Moser, J. and Jahn, D.: Bacteriochlorophyll Biosynthesis: Chlorophyllide *a* Oxidoreductase from *Roseobacter denitrificans*. (Poster) Jahrestagung der VAAM, Bremen, Deutschland (2013).

Kiesel, S., Lange, C., Wätzlich, D., Virus, S., Rüdiger, W., Scheer, H., Reijerse, E., Lubitz, W., Moser, J. and Jahn, D.: Characterization of Chlorophyllide *a* Oxidoreductase from *Roseobacter denitrificans*. (Poster) ICTPPO Tagung, Wuhan, China (2013).

Meinen Eltern

Bernhard & Elsbeth Kiesel

„Wer sein Ziel kennt, findet den Weg“

Laotse, chinesischer Denker

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen.....	VIII
1 Einleitung.....	10
1.1 Photosynthese	10
1.2 Struktur und Funktion von Bakteriochlorophyll und Chlorophyll	12
1.3 Biosynthese von Chlorophyllen und Bakteriochlorophyllen.....	15
1.4 Licht-unabhängige Protochlorophyllid <i>a</i> Oxidoreduktase (DPOR).....	19
1.5 Molybdän-abhängige Nitrogenase.....	23
1.6 Chlorophyllid <i>a</i> Oxidoreduktase	26
1.7 Zielsetzung	32
2 Material und Methoden.....	33
2.1 Materialien.....	33
2.1.1 Geräte.....	33
2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel.....	34
2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide	37
2.1.4 Oligonukleotide.....	39
2.2 Sterilisation, Medien und Medienzusätze	39
2.2.1 Sterilisation	39
2.2.2 LB-Medium.....	40
2.2.3 PY-Medium.....	40
2.2.4 RCV 2/3 PY-Medium	40
2.2.5 Medienzusätze.....	41
2.3 Mikrobiologische Methoden.....	41
2.3.1 Kultivierung verschiedener Bakterienstämme	41
2.3.2 Bestimmung von Zelldichten	42
2.3.3 Lagerung von Bakterienzellen	43
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	43
2.4.1 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	43
2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA	44
2.4.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	45
2.4.4 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	45
2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.4.6 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	46
2.4.7 Ligation von DNA	46
2.4.8 Transformation von DNA	46
2.4.9 Ortsgerichtete Mutagenese.....	47
2.4.10 Sequenzierung von DNA	47
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	48

2.5.1	Rekombinante Proteinproduktion.....	48
2.5.2	Zellaufschluss	49
2.5.3	Affinitätschromatographie.....	50
2.5.4	Gelpermeationschromatographie.....	51
2.5.5	Konzentrierung von Proteinlösungen	52
2.5.6	<i>In vitro</i> [Fe-S]-Cluster-Rekonstitution	52
2.6	Proteincharakterisierung.....	53
2.6.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	53
2.6.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	53
2.6.3	Western-Blotting	54
2.6.4	N-terminale Proteinsequenzierung	55
2.6.5	UV/Vis-Spektroskopie	55
2.6.6	Bestimmung des Eisen-Gehaltes	55
2.6.7	Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie	56
2.6.8	Sequenzanalysen	57
2.7	Enzymaktivitätstest	57
2.7.1	Herstellung von Pchlide	57
2.7.2	Gekoppelter <i>in vitro</i> DPOR/COR-Aktivitätstest.....	58
2.8	Bindungsassay	58
2.8.1	Herstellung von Chlide.....	58
2.8.2	Reinigung von Chlide-gesättigtem (BchY/BchZ) ₂	59
2.9	Interaktionsstudien.....	59
2.9.1	Bildung des ternären COR-Komplexes auf einer S-Agarose-Säule.....	59
2.9.2	Bildung des ternären COR-Komplexes auf einer Protino® Glutathion-Agarose-Säule	60
3	Ergebnisse und Diskussion	61
3.1	Charakterisierung der COR-Untereinheiten BchX, BchY und BchZ.....	61
3.1.1	Klonierung, rekombinante Produktion und Reinigung von (BchY/BchZ) ₂ .	61
3.1.2	Klonierung, rekombinante Produktion und Reinigung von (BchX) ₂	65
3.1.3	Analytische Gelpermeationschromatographie von (BchY/BchZ) ₂	68
3.2	<i>In vitro</i> COR-Aktivität	69
3.3	(BchX)₂ enthält einen [4Fe-4S]-Cluster	71
3.3.1	UV/Vis-Spektroskopie und Rekonstitution von (BchX) ₂	71
3.3.2	EPR-Analyse von (BchX) ₂	73
3.4	Substratbindung von (BchY/BchZ)₂	74
3.5	Nachweis des ternären COR-Komplexes	75
3.6	BchX-Sequenzanalyse	79
3.7	(BchY/BchZ)₂ koordiniert zwei nicht identische [4Fe-4S]-Cluster	81
3.7.1	UV/Vis-Spektroskopie von (BchY/BchZ) ₂	82
3.7.2	EPR-Analyse von (BchY/BchZ) ₂	83
3.8	Mutagenese der potentiellen Liganden des [4Fe-4S]-Clusters von (BchY/BchZ)₂	85
3.8.1	Cys-62, Cys-87, Cys-145 in BchY und Cys-35 in BchZ koordinieren den [4Fe-4S]-Cluster.....	85

3.8.2	Umwandlung der COR-Cluster-Liganden in das DPOR-ähnliche Liganden-Muster	92
3.9	Der enzymatische Mechanismus der COR	94
4	Zusammenfassung.....	97
5	Summary	99
6	Ausblick.....	100
7	Literaturverzeichnis.....	101
8	Anhang	112
8.1	Gewinnung des pGEX-<i>bchX</i> Vektors	112
8.2	Sequenz- und/oder Struktur-basierte Alignments der COR-Untereinheiten BchY und BchZ.....	113
	Danksagung	118

Abkürzungen

ALA	δ -Aminolävulinsäure
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bchl	Bakteriochlorophyll
Bchl _{ide}	Bakteriochlorophyllid <i>a</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
Cam ^r	Chloramphenicol-Resistenz
Chl	Chlorophyll
Chl _{ide}	Chlorophyllid <i>a</i>
COR	Chlorophyllid <i>a</i> Oxidoreduktase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPOR	Licht-unabhängige Protochlorophyllid <i>a</i> Oxidoreduktase (engl. <i>dark-operative protochlorophyllide a oxidoreductase</i>)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EPR	Elektronenspinresonanz (engl. <i>electron paramagnetic resonance</i>)
Farn	Farnesyl-Rest
for	vorwärts (engl. <i>forward</i>)
G	Einheit Gauß
GG	Geranylgeranyl-Rest
GS	Grundstruktur
GST	Glutathion-S-Transferase
GPC	Gelpermeationschromatographie
His ₆ -Tag	Histidin-Tag
IDA	Iminodiessigsäure (engl. <i>iminodiacetic acid</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

Km ^r	Kanamycin-Resistenz
LB	(engl. <i>lysogeny broth</i>)
LPOR	Licht-abhängige Protochlorophyllid Oxidoreduktase
MCS	Multiple Cloning Site (engl. <i>multiple cloning site</i>)
MWCO	Molekulargewichtsgrenzwert (engl. <i>molecular weight cut off</i>)
MW	Mikrowellen
NDT	Natriumdithionit
OD	optische Dichte
„off state“	Aus-Zustand (engl.)
„on state“	Ein-Zustand (engl.)
organ.	organisch
p.a.	für die Analyse; chemische Reinheit (lat. <i>pro analysi</i>)
Pchl _a	Protochlorophyllid <i>a</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pdb	Proteindatenbank
Phy	Phetyl-Rest
p.s.i.	Pfund pro Quadratzoll; Maßeinheit des Druckes (engl. <i>pound per square inch</i>)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
Rc	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
Rd	<i>Roseobacter denitrificans</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
Rs	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
RT	Raumtemperatur
RZ	Reaktionszentrum
PY	(engl. <i>peptone-yeast</i>)
rev	rückwärts (engl. <i>reverse</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sp ^r	Spectinomycin-Resistenz
S _v	Säulenvolumen
TCA	Tricarbonsäure (engl. <i>tricarmonic acid</i>)
Te	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Trx/His ₆ /S-Tag	Thioredoxin/Histidin ₆ /S-Tag
Tet ^r	Tetracyclin-Resistenz
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar (engl. <i>visible</i>)
(v/v)	(engl. <i>volume per volume</i>)
(w/v)	(engl. <i>weight per volume</i>)

1 Einleitung

1.1 Photosynthese

“What is the most important process that takes place on Earth? Many scientists would answer: photosynthesis“ (Silverstein *et al.*, 2008, S. 4). Denn ohne die biochemischen Prozesse der Photosynthese wäre ein Leben auf der Erde nicht möglich. Vielen phototrophen Organismen dient bei der Photosynthese das Licht der Sonne als Energiequelle, um Kohlendioxid in energiereiche, organische Verbindungen umzuwandeln (Gupta *et al.*, 1999).

Phototrophe Eukaryonten, wie Pflanzen und einige Algenarten sowie Cyanobakterien bilden bei der oxygenen Photosynthese molekularen Sauerstoff, wobei sie Wasser als Elektronendonator verwenden (Blankenship, 1992; Gupta *et al.*, 1999). Die Anreicherung von molekularem Sauerstoff in der Atmosphäre durch die Photolyse vor 2 Milliarden Jahren ermöglichte die Entwicklung der heutigen aeroben, eukaryotischen Lebensformen (Raymond & Blankenship, 2008). Die Chloroplasten, die bei der eukaryotischen Photosynthese genutzt werden, haben möglicherweise ihren Ursprung in einer Endosymbiose mit Cyanobakterien (Margulis & Chapman, 1998).

Purpur-, Grüne- und Heliobakterien produzieren dagegen keinen Sauerstoff (anoxygene Photosynthese). Sie nutzen alternative Elektronendonoren, wie Schwefelwasserstoff, molekularen Schwefel, molekularen Wasserstoff oder organische Verbindungen (Kiang *et al.*, 2007).

Oxygene Phototrophe besitzen zwei Reaktionszentren (RZ) vom Typ I und II, die über eine Elektronentransportkette miteinander verbunden sind. Die Wasserspaltung und Bildung von Sauerstoff erfolgen am Typ II RZ. Am Typ I RZ werden die Elektronen auf NADP⁺ übertragen. Im Vergleich dazu besitzen anoxygene Phototrophe entweder ein RZ vom Typ I oder vom Typ II (Blankenship, 2010; Nelson & Junge, 2015). Die Reaktionszentren und Antennenkomplexe sind in Purpurbakterien, Heliobakterien und Grünen Bakterien membrangebunden oder in den Membranen der Chlorosomen lokalisiert. Cyanobakterien und die Chloroplasten der Pflanzen besitzen

Thylakoidmembranen als spezifische Kompartimente für die oxygene Photosynthese (Murat *et al.*, 2010).

Die Lichtenergie wird über die Photosynthesepigmente, wie z. B. Bakteriochlorophyll (Bchl) oder Chlorophyll (Chl), in den Reaktionszentren und den Antennenkomplexen absorbiert. Angeregte Elektronen durchlaufen in den Reaktionszentren eine Elektronen-Transportkette und bauen dabei eine protonenmotorische Kraft über die Membran auf, welche zur ATP-Synthese genutzt wird. Die in ATP und den Reduktionsäquivalenten NADPH + H⁺, NADH + H⁺ und Ferredoxin konservierte Energie wird bei Cyano- und Purpurbakterien für die CO₂-Fixierung über den Calvin-Zyklus verwendet. Alternativ werden der Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) (Grüne Schwefelbakterien) und der Hydroxypropionat-Weg (Grüne Nicht-Schwefel Bakterien) genutzt (Tabelle 1) (Blankenship, 1992; Buchanan, 1992; Strauss & Fuchs, 1993).

Tabelle 1: Eigenschaften phototropher Bakterien modifiziert nach Fuchs *et al.* (2007).

	Cyano- bakterien	Purpur- bakterien	Grüne Schwefel- bakterien	Grüne Nicht- Schwefel- bakterien	Helio- bakterien
Elektronen- donor	H ₂ O	H ₂ S, organ. Verbindungen	H ₂ S	H ₂ , organ. Verbindungen	Organ. Verbindungen
CO ₂ - Fixierung	Calvin-Zyklus	Calvin-Zyklus	TCA-Zyklus	Hydroxy- propionat-Weg	-
RZ	Typ I und II	Typ II	Typ I	Typ II	Typ I
Membran	Thylakoide	Intracyto- plasmatische Membran	Chlorosomen	Chlorosomen	Cytoplasma- membran
Pigmente	Chl <i>a, b, d, f</i>	Bchl <i>a, b</i>	Bchl <i>a, c, d, e</i>	Bchl <i>a, c</i>	Bchl <i>g</i>

Oxygene Photosynthese betreibende Organismen nutzen hauptsächlich Chlorophylle für ihren Elektronentransport. Bei den anoxygenen, phototrophen Bakterien sind verschiedene, spezielle Bakteriochlorophylle beteiligt (Tabelle 1). Purpurbakterien beispielsweise nutzen Bchl *a* und *b*. In Grünen Bakterien sind auch Bchl *c, d* und *e* zu finden. Heliobakterien verwenden Bchl *g*, das nur in dieser Gruppe von Bakterien vorhanden ist (Kiang *et al.*, 2007; Raymond, 2008).

1.2 Struktur und Funktion von Bakteriochlorophyll und Chlorophyll

Bakteriochlorophylle und Chlorophylle zählen zu der großen Gruppe der Tetrapyrrole. In sämtlichen Organismen fungieren Tetrapyrrole als wichtige prosthetische Gruppe im Rahmen von vielen grundlegenden, biologischen Prozessen (Schlicke *et al.*, 2015). Neben den Tetrapyrrolen Bchl und Chl gibt es Häm, Häm d_1 , Sirohäm, Cobalamin (Vitamin B₁₂), Coenzym F₄₃₀ und die linearen Phycobilin-Moleküle (Abbildung 1).

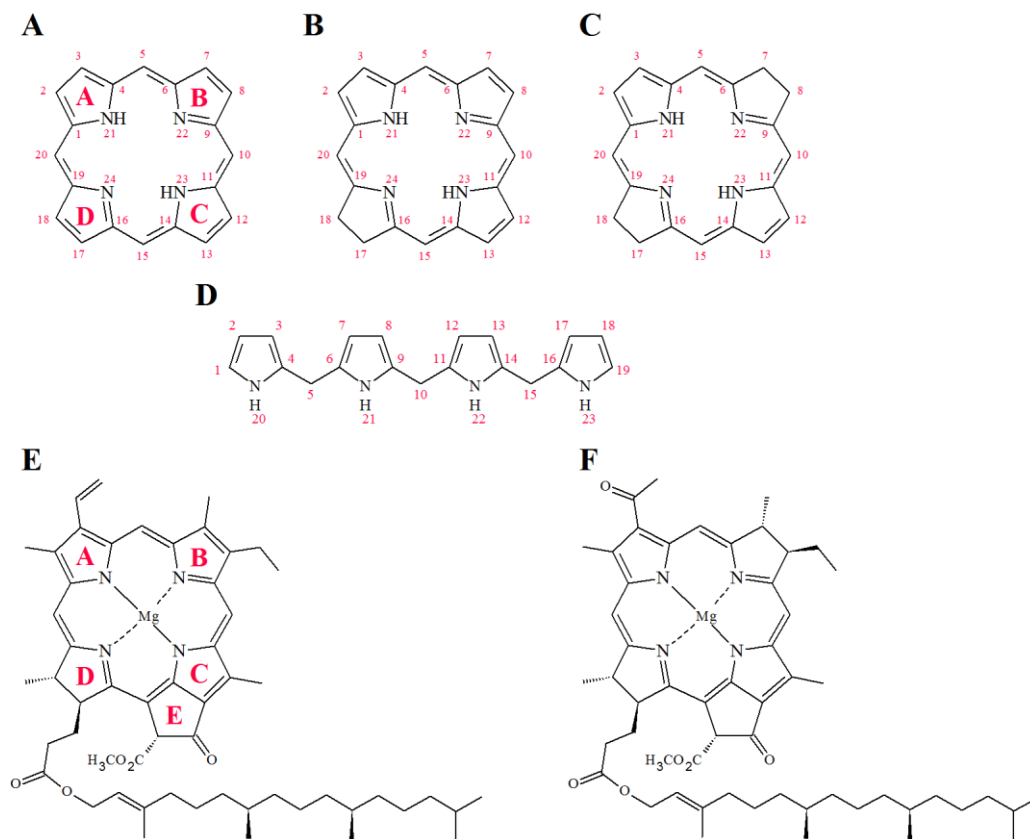


Abbildung 1: Tetrapyrrol-Strukturen.

A, Für viele zyklische Tetrapyrrole bildet Porphyrin die Grundstruktur. Die vier Pyrrol-Ringe werden im Uhrzeigersinn A bis D bezeichnet. **B**, Durch Reduktion der C-17/C-18-Doppelbindung des D-Ringes entsteht die Struktur des Chlorins. **C**, Beim Bakteriochlorin liegt eine reduzierte Doppelbindung zwischen C-7 und C-8 des B-Ringes vor. **D**, Die lineare, offenkettige Tetrapyrrol-Struktur der Bilin-Moleküle. **E**, Struktur von Chlorophyll *a*, mit einem zentralen Magnesium-Ion, dem zusätzlichen Ring E und einem Phytyl-Rest am C-17³-Atom. **F**, Struktur von Bchl *a*. Abbildung modifiziert nach Grimm (2006) und Battersby (2000).

Die zuvor genannten Tetrapyrrole sind an der Photosynthese, der Atmung, der Assimilation von Stickstoff und Schwefel, dem Elektronen-Transport, dem Gas-

Transport und als Kofaktoren an zahlreichen, enzymatischen Reaktionen beteiligt (Dammeyer & Frankenberg-Dinkel, 2008; Mochizuki *et al.*, 2010; Yin & Bauer, 2013). Tetrapyrrole sind linear (Abbildung 1 D) oder makrozyklisch (Abbildung 1 A-C) aus vier kondensierten Pyrrol-Ringen aufgebaut. Die zyklische Grundstruktur des Porphyrins besteht aus vier Pyrrol-Ringen, welche über Methinbrücken verbunden sind. Die meisten Tetrapyrrole leiten sich von diesem Grundgerüst ab (Battersby, 2000).

Bei dem am häufigsten in Pflanzen und Cyanobakterien vorkommenden Chl *a* handelt es sich um ein substituiertes Tetrapyrrol, in dem die vier Stickstoffatome ein zentrales Magnesium-Ion koordinieren. Im Gegensatz zum Porphyrin besitzen Chlorophylle einen reduzierten D-Pyrrol-Ring und weisen damit eine Chlorin-Ringstruktur auf (Abbildung 1 B). Weiterhin umfasst die Grundstruktur der Chlorophylle noch einen zusätzlichen isozyklischen Pentanonring (Ring E) und einen sehr hydrophoben Alkohol, welcher gebunden am C-17³-Atom vorliegt (Abbildung 1 E). Bakteriochlorophylle sind ähnlich zu den Chlorophyllen aufgebaut. Bchl *a* unterscheidet sich von der Chlorin-Struktur durch die zusätzliche Reduktion des Pyrrol-Ringes B an der C-7/C-8-Doppelbindung (Abbildung 1 C und F) (Battersby, 2000; Czarnecki & Grimm, 2012). Die verschiedenen Bchl- und Chl-Varianten besitzen unterschiedliche, substituierte Reste (Abbildung 2).

Neben dem Phytol können auch Farnesol oder Geranylgeraniol an C-17³ kondensiert vorliegen. Aufgrund der konjugierten Doppelbindungen absorbieren die unterschiedlichen Pigment-Moleküle Energie im sichtbaren Bereich (380-460 nm) und im nahen Infrarot-Bereich (600-850 nm). Somit ergeben sich durch die Chlorin- und Bakteriochlorin-Struktur sowie die Substituenten unterschiedliche, charakteristische Absorptionsspektren. Die unterschiedlichen Absorptionsspektren der Bakteriochlorophylle und Chlorophylle ermöglichen somit eine optimale Anpassung an verschiedene Umgebungsbedingungen (Grimm, 2006).

A

B

Pigment	R ₂	R ₃	R ₇	R ₈ (R ₈ ^a R ₈ ^b)	R ₁₂	R ₁₃	R ₁₇	R ₂₀	GS
Chl <i>a</i>	CH ₃	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	COOCH ₃	CH ₂ CH ₂ COO-Phy	H	A
Chl <i>b</i>	CH ₃	C ₂ H ₃	CHO	C ₂ H ₅	CH ₃	COOCH ₃	CH ₂ CH ₂ COO-Phy	H	A
Chl <i>c</i>	CH ₃	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅ oder C ₂ H ₃	CH ₃	COOCH ₃	CH=CHCOOH	H	A
Chl <i>d</i>	CH ₃	CHO	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	COOCH ₃	CH ₂ CH ₂ COO-Phy	H	A
Chl <i>f</i>	CHO	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	COOCH ₃	CH ₂ CH ₂ COO-Phy	H	A
Divinyl-Chl <i>a</i>	CH ₃	C ₂ H ₃	CH ₃	C ₂ H ₃	CH ₃	COOCH ₃	CH ₂ CH ₂ COO-Phy	H	A
Divinyl-Chl <i>b</i>	CH ₃	C ₂ H ₃	CHO	C ₂ H ₃	CH ₃	COOCH ₃	CH ₂ CH ₂ COO-Phy	H	A
Bchl <i>a</i>	CH ₃	COCH ₃	CH ₃	H/C ₂ H ₅	CH ₃	COOCH ₃	CH ₂ CH ₂ COO-Phy	H	B
Bchl <i>b</i>	CH ₃	COCH ₃	CH ₃	=CH-CH ₃	CH ₃	COOCH ₃	CH ₂ CH ₂ COO-Phy	H	B
Bchl <i>c</i>	CH ₃	CHOH-CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH _n (CH ₃) _{3-n}	CH ₃ /C ₂ H ₅	H	CH ₂ CH ₂ COO-Farn/andere	CH ₃	A
Bchl <i>d</i>	CH ₃	CHOH-CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH _n (CH ₃) _{3-n}	CH ₃ /C ₂ H ₅	H	CH ₂ CH ₂ COO-Farn/andere	H	A
Bchl <i>e</i>	CH ₃	CHOH-CH ₃	CHO	CH ₂ CH _n (CH ₃) _{3-n}	C ₂ H ₅	H	CH ₂ CH ₂ COO-Farn/andere	CH ₃	A
Bchl <i>g</i>	CH ₃	C ₂ H ₃	CH ₃	=CH-CH ₃	CH ₃	COOCH ₃	CH ₂ CH ₂ COO-GG	H	B

Abbildung 2: Chemische Strukturen der unterschiedlichen Bakteriochlorophylle und Chlorophylle.

Die chemische Grundstruktur (GS) ist entweder ein Chlorin- (A) oder Bakteriochlorin-Molekül (B). Die verschiedenen Substitutionen an unterschiedlichen Ringpositionen sind in Rot gekennzeichnet. Abkürzungen: Chl, Chlorophyll; Bchl, Bakteriochlorophyll; Phy, Phytol-Rest; Farn, Farnesyl-Rest; GG, Geranylgeranyl-Rest. Strukturen und Tabelle modifiziert nach Grimm (2006) und Willows *et al.* (2013).

Bakteriochlorophylle und Chlorophylle sind Bestandteile der Reaktionszentren des Photosyntheseapparates. Daneben befindet sich in den Antennenkomplexen eine große Anzahl an Pigmenten, um effizient die Energie des Sonnenlichts an die Reaktionszentren weiterzuleiten. Durch die Absorption eines Photons gehen die konjugierten Polyene in einen angeregten Zustand über und geben Elektronen an einen Akzeptor ab. Diese photoinduzierte Ladungstrennung wird über mehrere Pigmente bis zum

Reaktionszentrum weitergeleitet. Dort wird die Energie z. B. zur ATP-Synthese und abschließend zur CO₂-Assimilation verbraucht (Berg *et al.*, 2007; Blankenship, 1992).

1.3 Biosynthese von Chlorophyllen und Bakteriochlorophyllen

Alle Tetrapyrrole haben δ -Aminolävulinsäure (ALA) als gemeinsames Vorläufer-Molekül. ALA kann durch zwei verschiedene Stoffwechselwege gebildet werden. In allen Eukaryonten und einigen Purpurbakterien entsteht ALA als Teil des Shemin-Stoffwechselweges (Shemin & Russell, 1953). Die ALA-Synthase katalysiert hierbei die Kondensation und anschließende Decarboxylierung von Succinyl-Koenzym A und Glycin. Im alternativen C₅-Stoffwechselweg (Beale & Castelfranco, 1973) ist ALA das Produkt aus zwei enzymatischen Reaktionen ausgehend von Glutamat. Pflanzen, Archaeen und die meisten photosynthetischen Bakterien nutzen den zuletzt genannten Syntheseweg (Jahn & Heinz, 2009). Ausgehend von ALA werden die verschiedenen Bchl- und Chl-Varianten gebildet (Abbildung 3).

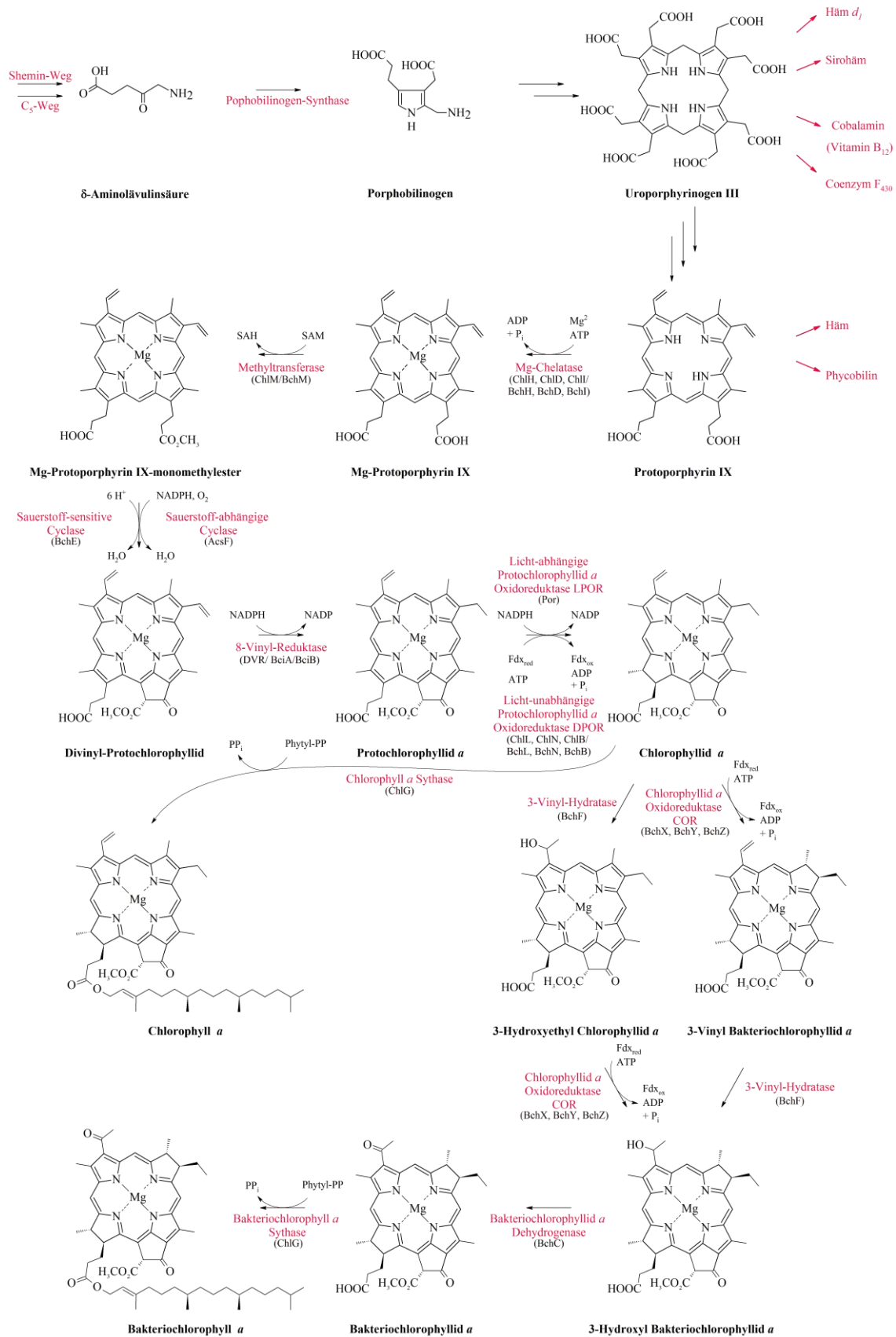


Abbildung 3: Biosynthese-Weg für Bakteriochlorophylle und Chlorophylle.

δ -Aminolävulinsäure (ALA) wird über den Shemin-Weg oder den C₅-Weg synthetisiert. Ausgehend von ALA werden Chlorophylle und Bakteriochlorophylle synthetisiert (beteiligte Enzyme sind rot markiert). Ausgehend von diesen Biosynthese-Wegen gibt es abzweigende Biosynthese-Wege (rote Pfeile).

Im nächsten Schritt wird aus zwei ALA-Molekülen durch Kondensation das zyklische Porphobilinogen gebildet. Aus vier Porphobilinogen-Molekülen entsteht in zwei weiteren Reaktionen Uroporphyrinogen III. Ausgehend von diesem Molekül kann auch die Biosynthese der Tetrapyrrole Häm *d_I*, Sirohäm, Vitamin B₁₂ und Koenzym F₄₃₀ erfolgen (Czarnecki & Grimm, 2012; Yin & Bauer, 2013).

Nach mehreren Decarboxylierungen und einer Oxidation wird Uroporphyrinogen III in das symmetrische, Metall-freie und komplett konjugierte Porphyrin Protoporphyrin IX umgewandelt (Beale, 1999). Für die Biosynthese von Häm oder den Phycobilin-Molekülen erfolgt der Eisen-Einbau ausgehend von Protoporphyrin IX (Tanaka & Tanaka, 2007; Yin & Bauer, 2013).

Unter ATP-Verbrauch erfolgt im Biosyntheseweg von Chlorophyllen und Bakteriochlorophyllen der Einbau von Magnesium durch die Magnesium-Chelatase. Das durch diesen Enzymkomplex (ChlH, ChlD, ChlI oder aber BchH, BchD, BchI) entstandene Mg-Protoporphyrin IX wird durch eine Methyltransferase (BchM/ChlM) in Abhängigkeit von S-Adenosyl-L-methionin an Atom C-13² methyliert (Chew & Bryant, 2007). Der nächste Schritt beinhaltet die Bildung des isozyklischen Ringes E am entstandenen Mg-Protoporphyrin IX-Monomethylester. Diese oxidative Reaktion wird entweder durch die Sauerstoff-abhängige (AcsF) oder die Sauerstoff-sensitive (BchE) Cyclase katalysiert (Chew & Bryant, 2007). Dieser zentrale Schritt führt zur Verschiebung des Absorptionsspektrums vom roten in den grünen sichtbaren Spektralbereich und ist bis heute noch wenig verstanden (Hollingshead *et al.*, 2012).

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nicht genau aufgeklärt, an welcher Stelle im Syntheseweg die Reduktion der 8-Vinylgruppe am B-Ring stattfindet (Heyes & Hunter, 2009). In Pflanzen wurden verschiedene 8-Vinyl-Reduktasen (DVR; Divinyl-Reduktasen) mit einer breiten Substratspezifität identifiziert, jedoch zeigten die Reduktasen von unterschiedlichen Arten verschiedene Spezifitäten (Chen, 2014; Wang *et al.*, 2013). Die homologen Proteine BciA und BciB in photosynthetischen Bakterien zeigen ebenfalls 8-Vinyl-Reduktase-Aktivität (Liu & Bryant, 2011; Saunders *et al.*, 2013).

Einer der interessantesten Schritte der Bchl- und Chl-Biosynthese ist die Reduktion der C-17/C-18-Doppelbindung des D-Ringes. Diese Reaktion kann durch zwei unterschiedliche Enzyme katalysiert werden. Die Licht-abhängige Protochlorophyllid Oxidoreduktase (LPOR) nutzt NADPH als Reduktionsmittel und benötigt Licht für die Katalyse (Blankenship, 2014). Die Licht-unabhängige Protochlorophyllid Oxidoreduktase (DPOR, *engl. dark-operative protochlorophyllide a oxidoreductase*) katalysiert die stereospezifische Reduktion vom Porphyrin- zum Chlorin-Molekül unter ATP-Verbrauch und nutzt Ferredoxin als Reduktionsmittel (Moser *et al.*, 2013). Diese Reaktion wird in Kapitel 1.4 näher beschrieben.

Der letzte Schritt der Chl *a* Biosynthese wird durch die Chlorophyll-Synthase (ChlG) katalysiert. Dabei wird der Phetyl-Rest an die Carbonylgruppe des D-Ringes am Chlorophyllid (Chlide) *a* gebunden. Von Chl *a* ausgehend werden Chl *b*, *d* und *f* durch verschiedene Reaktionen und Enzyme gebildet (Chen, 2014).

Bakteriochlorophylle haben im Vergleich zu Chlorophyllen einen reduzierten B-Ring und andere Substituenten am A-Ring. Die Biosynthese der Bakteriochlorophylle erfolgt ausgehend von Chlide *a* (Chew & Bryant, 2007). Die Reduktion der C-7/C-8-Doppelbindung am B-Ring wird durch einen Enzymkomplex (BchX, BchY, BchZ) mit hoher Sequenzidentität zur DPOR katalysiert. Unter ATP-Verbrauch wird der Pyrrol-Ring durch die Chlorophyllid *a* Oxidoreduktase (COR) reduziert (Nomata *et al.*, 2006b). Diese Reaktion wird in Kapitel 1.6 genauer betrachtet. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der COR aus *Roseobacter denitrificans*. In kürzlich veröffentlichten Studien wurde nachgewiesen, dass das COR-Enzym aus BchX, BchY und BchZ ebenfalls die zuvor erwähnte 8-Vinylgruppe reduzieren kann (Harada *et al.*, 2014; Tsukatani *et al.*, 2015; Tsukatani *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2014). Die 3-Vinyl Hydratase (BchF) wandelt dann die 3-Vinyl-Gruppe am Ring A in eine Hydroxyethyl-Gruppe um (Heyes & Hunter, 2009). Es wurde beobachtet, dass die letzten beiden beschriebenen Schritte auch in umgekehrter Reihenfolge ablaufen können (Biel & Marrs, 1983; Bollivar *et al.*, 1994; Pudek & Richards, 1975).

Die Oxidation der Hydroxyethyl-Gruppe des 3-Hydroxyethyl-Bakteriochlorophyllids *a* wird durch die Bakteriochlorophyllid *a* Dehydrogenase (BchC) katalysiert. Die letzte Reaktion im Biosynthese-Weg von Bakteriochlorophyllen ist die Veresterung der Propionat-Seitenkette am D-Ring mit Phytol durch die Bakteriochlorophyll *a*-Synthase

(Heyes & Hunter, 2009). Die unterschiedlichen Bakteriochlorophylle werden ausgehend von Bchl *a* in weiteren enzymkatalysierten Reaktionen gebildet (Chew & Bryant, 2007).

1.4 Licht-unabhängige Protochlorophyllid *a* Oxidoreduktase (DPOR)

Charakteristisch für sowohl Bakteriochlorophylle als auch Chlorophylle ist die reduzierte C-17/C-18-Doppelbindung am D-Ring der Porphyrin-Grundstruktur. Diese zentrale Reaktion im Biosyntheseweg, in der Protochlorophyllid (Pchilde) in Chlide umgewandelt wird, kann durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert werden (Abbildung 4).

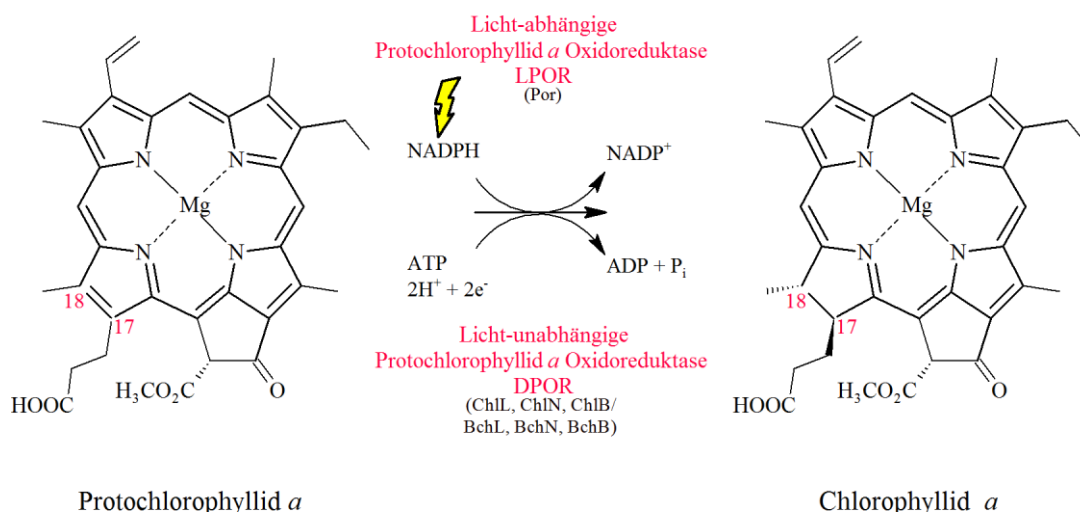


Abbildung 4: Spezifische Reduktion der C-17/C-18-Doppelbindung in der Biosynthese von Bchl und Chl.

Die Licht-abhängige Protochlorophyllid Oxidoreduktase (LPOR) nutzt NADPH als Reduktionsmittel und benötigt Licht zur Katalyse (Blankenship, 2014). Die Licht-unabhängige Protochlorophyllid Oxidoreduktase (DPOR) katalysiert die stereospezifische 2 e⁻-Reduktion vom Porphyrin- zum Chlorin-Molekül unter ATP-Verbrauch (Moser *et al.*, 2013).

Dabei handelt es sich um die Licht-abhängige Protochlorophyllid Oxidoreduktase (LPOR) oder die Licht-unabhängige Protochlorophyllid Oxidoreduktase (DPOR) (Fujita & Bauer, 2000; Heyes & Hunter, 2005). In Angiospermen ist ausschließlich die LPOR vorhanden, wohingegen in Cyanobakterien, Algen und Gymnospermen LPOR und DPOR zu finden sind (Fujita, 1996). Dagegen besitzen einige anoxygene, phototrophe

Bakterien nur die DPOR (Xiong *et al.*, 1998). In diesem Kapitel wird der Enzymkomplex der DPOR näher betrachtet.

In Bchl synthetisierenden Organismen kodieren die Gene *bchL*, *bchN* und *bchB* für die drei Untereinheiten BchL, BchN und BchB der DPOR. In Chl synthetisierenden Organismen werden die DPOR-Untereinheiten durch die orthologen Untereinheiten ChlL, ChlN und ChlB von den Genen *chlL*, *chlN* und *chlB* kodiert (Abbildung 5 A) (Bollivar *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1997).

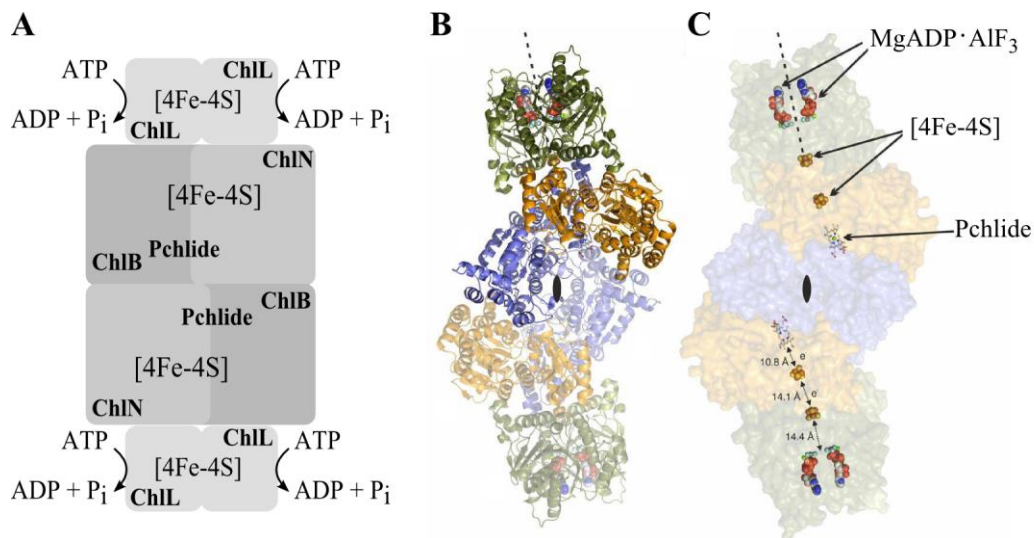


Abbildung 5: Struktur der DPOR aus *Prochlorococcus marinus*.

A, Schematischer Aufbau der drei Untereinheiten der DPOR; **B**, Struktur des ternären DPOR-Komplexes aus *P. marinus* mit den Untereinheiten ChlL (grün), ChlN (orange) und ChlB (blau); **C**, Die Übertragung der Elektronen über die [4Fe-4S]-Cluster zum Substrat ist gezeigt. Atome wurden wie folgt dargestellt: Eisen (orange), Schwefel (gelb), Sauerstoff (rot), Kohlenstoff (grau), Stickstoff (blau), Magnesium (dunkelgrün), Aluminium (hellgrün) und Fluor (hellblau) (modifiziert nach Moser *et al.*, 2013).

Die DPOR wird in zwei Subkomplexe unterteilt (Abbildung 5 A). Mit Hilfe der Kristallstrukturen von BchL aus *Rhodobacter sphaeroides* und ChlL aus *P. marinus* wurde die homodimere Struktur dieses DPOR-Subkomplexes bestätigt. Es wurde auch deutlich, dass sich ein [4Fe-4S]-Cluster zwischen den beiden Monomeren befindet. Außerdem sind zwei ATP-Bindestellen vorhanden. (BchL)₂/(ChlL)₂ ist somit eine ATP-abhängige Reduktase mit einem Sauerstoff-sensitiven [4Fe-4S]-Cluster (Bröcker *et al.*, 2008b; Moser *et al.*, 2013; Nomata *et al.*, 2006a; Sarma *et al.*, 2008). In Mutationsstudien wurde gezeigt, dass der exponierte Cluster von vier Cysteinen koordiniert wird. Dabei

stellt jede Untereinheit zwei Cystein-Reste (Cys-97 und Cys-131; *Chlorobium tepidum* Nummerierung) bereit (Bröcker *et al.*, 2008a).

Die DPOR-Untereinheiten ChlN und ChlB bilden die katalytische Untereinheit mit einer heterotetrameren Struktur (Abbildung 5 A) (Nomata *et al.*, 2005). Dieses Heterotetramer besitzt zwei [4Fe-4S]-Cluster und zwei Substratbindestellen für Pchlde (Bröcker *et al.*, 2008b; Nomata *et al.*, 2008). Die [4Fe-4S]-Cluster werden durch ein seltenes Liganden-Muster koordiniert. Die Kristallstrukturen von (BchN/BchB)₂ aus *Rhodobacter capsulatus* (Muraki *et al.*, 2010) und (ChlN/ChlB)₂ aus *Thermosynechococcus elongatus* (Bröcker *et al.*, 2010a) zeigten, dass drei Cystein-Liganden und ein Aspartat-Ligand den Cluster koordinieren. Die meisten in der Literatur bekannten [4Fe-4S]-Cluster werden durch vier Cystein-Reste koordiniert. Dennoch sind auch seltene Cluster-Liganden, wie zum Beispiel Histidin, Aspartat, Arginin und Serin bekannt (Bak & Elliott, 2014; Shepard *et al.*, 2011). Der Aspartat-Ligand wird zusätzlich durch Cys-95 (*T. elongatus* Nummerierung) stabilisiert (Bröcker *et al.*, 2010a). Basierend auf Elektronenspinresonanz-Experimenten mit der (ChlN/ChlB)₂-Untereinheit aus *P. marinus* wurden zwei nicht identische [4Fe-4S]-Cluster vorgeschlagen. Die verschiedenen g-Werte der beiden Cluster sind möglicherweise auf geringe Unterschiede der jeweiligen Cluster-Koordination zurückzuführen (Bröcker *et al.*, 2008b).

Bröcker *et al.* (2010b) postulierten aufgrund verschiedener biochemischer Experimente einen möglichen katalytischen Reaktionsmechanismus der DPOR. Zunächst überträgt der natürliche Elektronendonator Ferredoxin ein Elektron auf den [4Fe-4S]-Cluster von (ChlL)₂ (Nomata *et al.*, 2005). Nachdem zwei ATP-Moleküle gebunden wurden, verändert (ChlL)₂ als dynamisches „Switch“-Protein seine Konformation. Dann ermöglicht die mit dem Substrat Pchlde gebundene (ChlN/ChlB)₂-Untereinheit eine transiente, ternäre Komplexbildung (ChlL)₂(ChlN/ChlB)₂(ChlL)₂. Während der ATP-Hydrolyse kann durch die Protein-Protein-Interaktion der drei Untereinheiten das Elektron vom [4Fe-4S]-Cluster der (ChlL)₂-Untereinheit auf die [4Fe-4S]-Cluster von (ChlN/ChlB)₂ übertragen werden. Nach der Hydrolyse kommt es zur Dissoziation des ternären DPOR-Komplexes. Für eine vollständige Reduktion des Substrates muss dieser Zyklus zweimal durchlaufen werden (Bröcker *et al.*, 2010b). Es konnte auch gezeigt werden, dass Nikotinamid die DPOR-Aktivität inhibiert, indem die Elektronen-

Übertragung vom (BchL)₂-Dimer auf das (BchN/BchB)₂-Heterotetramer gestört wird (Nomata *et al.*, 2013).

Aus der Kristallstruktur des Heterooktamer-Komplexes der DPOR aus *P. marinus* wurden wichtige Informationen für den Reaktionsmechanismus der DPOR abgeleitet (Abbildung 5 B) (Moser *et al.*, 2013). Mit Hilfe des ATP-Analogons MgADP·AlF₃ wurde der transiente Übergangszustand der DPOR stabilisiert. MgADP·AlF₃ ist in der Lage, den trigonal-bipyramidalen Übergangszustand des γ-Phosphats beim nukleophilen Angriff des ATP-Moleküls durch ein Wasser-Molekül nachzuahmen. Die beiden homologen Untereinheiten ChlN und ChlB bilden eine pseudo 2-fache Symmetrieachse parallel zur 2-fachen Symmetrieachse von (ChlL)₂ (Abbildung 5 B). Durch die Interaktion der Untereinheiten werden die zwei [4Fe-4S]-Cluster und das Pchlde-Molekül linear angeordnet (Abbildung 5 C). Somit wird die Übertragung eines Elektrons über die Cluster auf das Substrat vermittelt. Basierend auf dem Vergleich dieser neuen Struktur mit der von Sarma *et al.* (2008) veröffentlichten (BchL)₂-Struktur wurde für (ChlL)₂ bei ADP-Bindung ein „off state“ mit niedriger Affinität zu (ChlN/ChlB)₂ postuliert. Dagegen wurde durch das ATP-Analogon ein „on state“ mit einer hohen Affinität zur (ChlN/ChlB)₂-Untereinheit induziert. Die damit verbundenen Konformationsänderungen wurden als eine Rotation der L-Monomere in Richtung des Dimer-Interface beschrieben (Moser *et al.*, 2013).

Die Kristallstrukturen für (BchN/BchB)₂ aus *R. capsulatus* (Muraki *et al.*, 2010) und (ChlL)₂(ChlN/ChlB)₂(ChlL)₂ aus *P. marinus* (Moser *et al.*, 2013) zeigten beide einen Hohlraum, in dem das Pchlde-Molekül gebunden vorliegt. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Untersuchungen zur Substratspezifität der DPOR überein. Geringe Veränderungen der Substituenten an den Ringen A–C am Pchlde werden von der DPOR toleriert. Im Gegensatz dazu werden Substrate mit Modifikationen am D-Ring nicht von der DPOR erkannt. Die DPOR ist auch in der Lage, die Substrate Divinyl-Protochlorophyllid *a* und Protochlorophyllid *b* umzusetzen (Bröcker *et al.*, 2008b).

Für die *trans*-spezifische Reduktion der Doppelbindung an der C-17/C-18 Doppelbindung des Pchlides werden neben zwei Elektronen auch zwei Protonen benötigt. Moser *et al.* (2013) und Muraki *et al.* (2010) stellten unabhängig voneinander fest, dass als Protonendonator für das C-17 des Chlides ein Aspartat-Rest der B-Untereinheit fungiert. Dagegen werden für das zweite Proton unterschiedliche Donoren vorgeschlagen.

Moser *et al.* (2013) schlugen ein Wasser-Molekül, das oberhalb des D-Ringes durch ein Histidin und durch die Propionat-Seitenkette des Substrates positioniert wird, als Protondonor für die C-18 Position vor. Ihre Annahme wurde durch Mutation des beteiligten Histidins bekräftigt. Die H394A-Mutante zeigte nur noch geringe DPOR-Aktivität. Muraki *et al.* (2010) schlugen die Propionat-Seitenkette am C-17-Atom als direkten Protondonor für die C-18 Position vor. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie (Nomata *et al.*, 2014) wurde gezeigt, dass durch ein einzeln übertragenes Elektron ein Pchlide-Anionen-Radikal entsteht. Dieses Radikal wird dann durch die Propionat-Seitenkette protoniert und die Reduktion von Pchlide durch eine weitere Elektronen-Übertragung und Protonierung durch den bereits erwähnten Aspartat-Rest abgeschlossen. Möglicherweise wird die Propionat-Seitenkette durch das zuvor vorgeschlagene Wasser-Molekül protoniert (Nomata *et al.*, 2014).

Die einzelnen Untereinheiten der DPOR zeigen deutliche Sequenzhomologien zur Nitrogenase (Raymond *et al.*, 2004). Somit wird die Nitrogenase im folgenden Kapitel genauer betrachtet.

1.5 Molybdän-abhängige Nitrogenase

In der Atmosphäre der Erde befinden sich 79 % des elementaren Stickstoffs in Form von N_2 , welcher von vielen Organismen aufgrund der energiereichen Dreifachbindung nicht verwertet werden kann. Um den Stickstoff in eine biologisch umsetzbare Form zu überführen, gibt es zwei Möglichkeiten (Yang *et al.*, 2011). Zum einen kann das industrielle Haber-Bosch-Verfahren zur Stickstoff-Fixierung angewendet werden (Schlögl, 2003). Zum anderen nutzen Mikroorganismen den Enzymkomplex der Nitrogenase, um den molekularen Stickstoff aus der Atmosphäre in Form von Ammonium zu fixieren (Burgess & Lowe, 1996).

Die am besten untersuchte Nitrogenase ist die Molybdän-abhängige Nitrogenase, auf die im Folgenden hauptsächlich eingegangen wird (Hu & Ribbe, 2011).

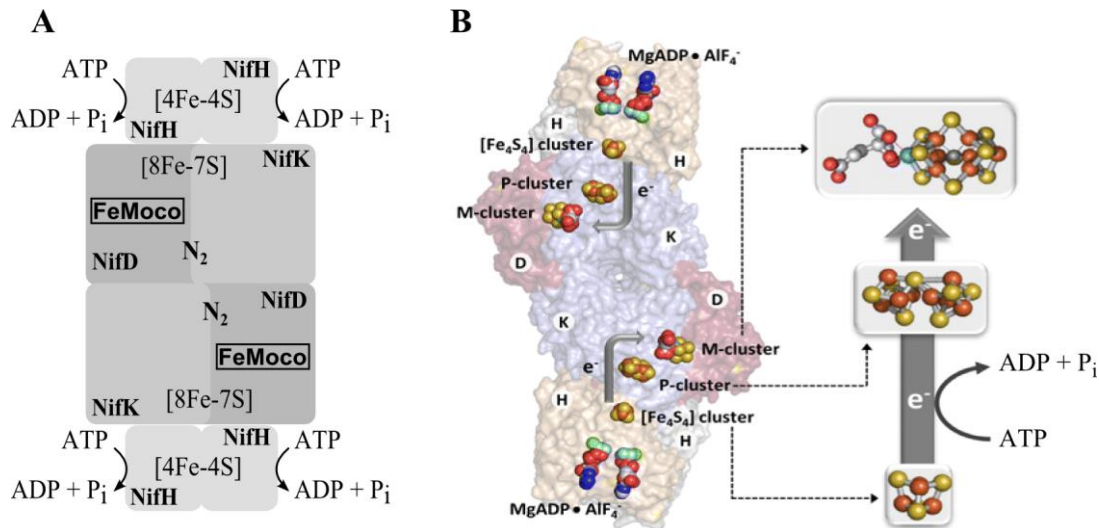


Abbildung 6: Struktur der Mo-abhängigen Nitrogenase von *Azobacter vinelandii*.

A, Schematischer Aufbau der drei Untereinheiten der Nitrogenase; **B**, Struktur des ternären Nitrogenase-Komplexes aus *A. vinelandii* mit den Untereinheiten NifH (gelb und grau), NifK (blau) und NifD (rot). Dargestellt ist die Übertragung der Elektronen über die Kofaktoren zum Substrat. Atome wurden wie folgt farblich gekennzeichnet: Eisen (orange), Schwefel (gelb), Molybdän (cyan), Sauerstoff (rot), Kohlenstoff (grau), Stickstoff (blau), Magnesium (dunkelgrün), Aluminium (hellgrün) und Fluor (hellblau) (modifiziert nach Hu & Ribbe, 2015 und Schindelin *et al.*, 1997).

Die Nitrogenase ist aus zwei sauerstoffsensitiven Subkomplexen aufgebaut (Hoffman *et al.*, 2014). Das Fe-Protein (NifH)₂ ist eine homodimere ATP-abhängige Reduktase (Abbildung 6 A). Zwischen den beiden Monomeren befindet sich ein [4Fe-4S]-Cluster, der von vier Cystein-Resten koordiniert wird (Abbildung 6 B). Dabei stellt jedes NifH zwei Cystein-Liganden bereit (Georgiadis *et al.*, 1992; Jang *et al.*, 2000). Die katalytische Untereinheit der Nitrogenase ist das FeMo-Protein (NifD/NifK)₂ (Abbildung 6 A). Dieses Heterotetramer ist in der Lage, N₂ zu Ammonium zu reduzieren (Kim & Rees, 1992). Im FeMo-Protein sind zwei unterschiedliche Metall-Cluster enthalten. Der [8Fe-7S]-P-Cluster befindet sich zwischen der NifD- und NifK-Untereinheit und wird durch sechs Cysteine koordiniert. Der FeMo-Kofaktor [Mo-7Fe-9S-C-Homocitrat], auch M-Cluster genannt, befindet sich in der NifD-Untereinheit (Abbildung 6). Der M-Cluster wird durch ein Histidin- und ein Cystein-Rest koordiniert (Chan *et al.*, 1993; Einsle *et al.*, 2002). Lange war nicht bekannt, welches Atom sich an der zentralen Stelle des FeMo-Kofaktors befindet. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass ein Carbid-Ion von den sechs Eisen-Atomen des M-Clusters koordiniert wird (Lancaster *et al.*, 2013; Spatzal *et al.*, 2011). Die drei bis heute bekannten, homologen Nitrogenase-Typen lassen sich durch ihr gebundenes Metall

im M-Cluster unterscheiden. Neben einem Eisen- oder Vanadium-Atom kann ein Molybdän-Atom gebunden sein (Hu & Ribbe, 2011).

Alle Untereinheiten der DPOR zeigen Sequenzähnlichkeiten zur Nitrogenase. BchL hat eine ~30 %ige Aminosäure-Sequenzidentität zur NifH-Untereinheit. Die DPOR-Untereinheiten BchN und BchB haben eine geringere Ähnlichkeit (15-20 %) zu den homologen NifD und NifK-Untereinheiten (Fujita & Bauer, 2003). Entgegen der Sequenzalignments sind sich BchN und NifK sowie BchB und NifD strukturell gesehen ähnlicher (Moser *et al.*, 2013).

Bei der Nitrogenase überträgt der natürliche Elektronendonator Ferredoxin ein Elektron auf den [4Fe-4S]-Cluster von (NifH)₂ (Mortenson, 1964). Die Elektronenübertragung ist mit der ATP-Hydrolyse gekoppelt. Nachdem zwei ATP-Moleküle gebunden wurden, verändert (NifH)₂, ebenso wie das homologe (ChlL)₂, als dynamisches „Switch“-Protein seine Konformation (Tezcan *et al.*, 2005). Während der ATP-Hydrolyse wird durch die Protein-Protein-Interaktion der drei Untereinheiten das Elektron vom [4Fe-4S]-Cluster des Fe-Proteins zuerst auf den P-Cluster und dann auf den M-Cluster des FeMo-Proteins übertragen (Abbildung 6 B). Nach der Hydrolyse dissoziieren (NifH)₂ und die reduzierte (NifD/NifK)₂-Untereinheit wieder (Hoffman *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2011). Die Gesamt-Reaktion der Nitrogenase kann durch die Reaktionsgleichung $\text{N}_2 + 8 \text{H}^+ + 16 \text{MgATP} + 8 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16 \text{MgADP} + 16 \text{P}_i$ beschrieben werden (Hu & Ribbe, 2011). Für die Gesamt-Reaktion werden bei der Übertragung eines Elektrons pro Zyklus acht Zyklen benötigt. Dennoch sind bis heute die genaue Substratbindestelle sowie der katalytische Mechanismus nicht eindeutig geklärt (Hoffman *et al.*, 2014; Hu & Ribbe, 2015).

Neben der DPOR und den beiden anderen Nitrogenase-Varianten gibt es noch weitere homologe Proteine zur Nitrogenase. Zum Beispiel dient das homologe Heterotetramer (NifE/NifN)₂ beim Aufbau des FeMo-Kofaktors als Gerüstprotein. (NifE/NifN)₂ gibt den prozessierten M-Cluster an die FeMo-Untereinheit der Nitrogenase weiter. Dieser Enzymkomplex besitzt an der Stelle des P-Clusters einen [4Fe-4S]-Cluster. In der NifE-Untereinheit ist ein L-Cluster ([8Fe-9S-C]) lokalisiert, der im Vergleich zum M-Cluster kein Molybdän und Homocitrat trägt (Hu & Ribbe, 2011). Bei der Maturation des FeMo-Kofaktors dient (NifH)₂ als ATP-abhängige, Molybdän und Homocitrat übertragende Insertase, während über die [4Fe-4S]-Cluster Elektronen übertragen werden (Hu & Ribbe, 2015).

In allen Methanbildnern und einigen Phototrophen sind die homologen Proteine NflH und NflD vorhanden (Moser & Bröcker, 2011). In phylogenetischen Analysen wurden diese Gensequenzen zwischen den Sequenzen der Nitrogenase und der DPOR eingeordnet (Raymond *et al.*, 2004). Sequenzalignments von NflH, NifH und ChlL zeigten eine konservierte ATP-Bindestelle und zwei konservierte Cystein-Reste, welche möglicherweise analog zur DPOR und Nitrogenase einen [4Fe-4S]-Cluster zwischen den Monomeren koordinieren könnten. Im NflD-Protein wurden keine konservierten Liganden des FeMo-Kofaktors gefunden, jedoch sind einige Liganden des P-Clusters konserviert (Hu & Ribbe, 2015). Studien mit *Methanocaldococcus jannaschii*, welcher weder Stickstoff fixiert noch Photosynthese betreibt, ließen vermuten, dass die Nfl-Proteine an der Biosynthese von Kofaktor F₄₃₀ beteiligt sind (Moser & Bröcker, 2011; Staples *et al.*, 2007).

Neben den genannten homologen Proteinen zeigt auch der Enzymkomplex der COR eine hohe Sequenzähnlichkeit zur Nitrogenase und zum vorher erwähnten Enzymkomplex der DPOR (Hu & Ribbe, 2015).

1.6 Chlorophyllid *a* Oxidoreduktase

Charakteristisch für die Synthese von Bakteriochlorophyllen ist die stereo- und regiospezifische Reduktion der C-7/C-8 Doppelbindung am B-Ring der Chlorin-Grundstruktur. In dieser zentralen Reaktion wird Childe zu Bakteriochlorophyllid (Bchl_{id}) durch die Chlorophyllid *a* Oxidoreduktase (COR) reduziert (Abbildung 7).

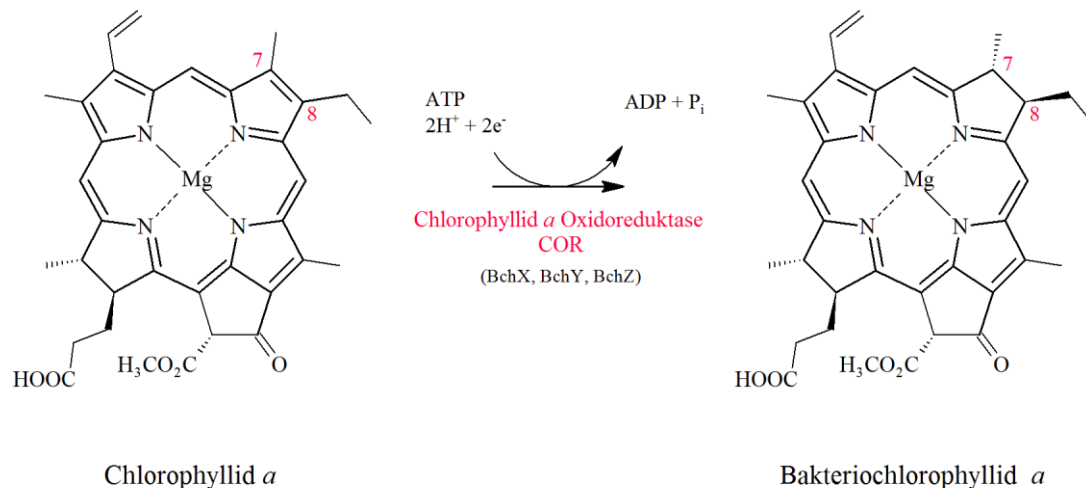


Abbildung 7: Reduktion der C-7/C-8 Doppelbindung in der Biosynthese von Bchl.

Unter ATP-Verbrauch katalysiert die Chlorophyllid *a* Oxidoreduktase (COR) die stereospezifische Reduktion von Chlorophyllid zu Bakteriochlorophyllid, wobei zwei Elektronen und Protonen sowie Ferredoxin als Reduktionsmittel benötigt werden (Nomata *et al.*, 2006b).

In mehreren Mutationsstudien wurde der *bchA*-Lokus als kodierende Region für die katalysierte Reduktion des COR-Enzyms identifiziert (Biel & Marrs, 1983; Hunter & Coomber, 1988; Yen & Marrs, 1976). Mit Hilfe von Sequenzanalysen wurde gezeigt, dass der *bchA*-Lokus drei offene Leseraster für die Gene *bchX*, *bchY* und *bchZ* enthält (Burke *et al.*, 1993a; McGlynn & Hunter, 1993). Die COR-Untereinheiten, die durch diese drei Gene kodiert sind, werden als BchX, BchY und BchZ bezeichnet (Abbildung 8).

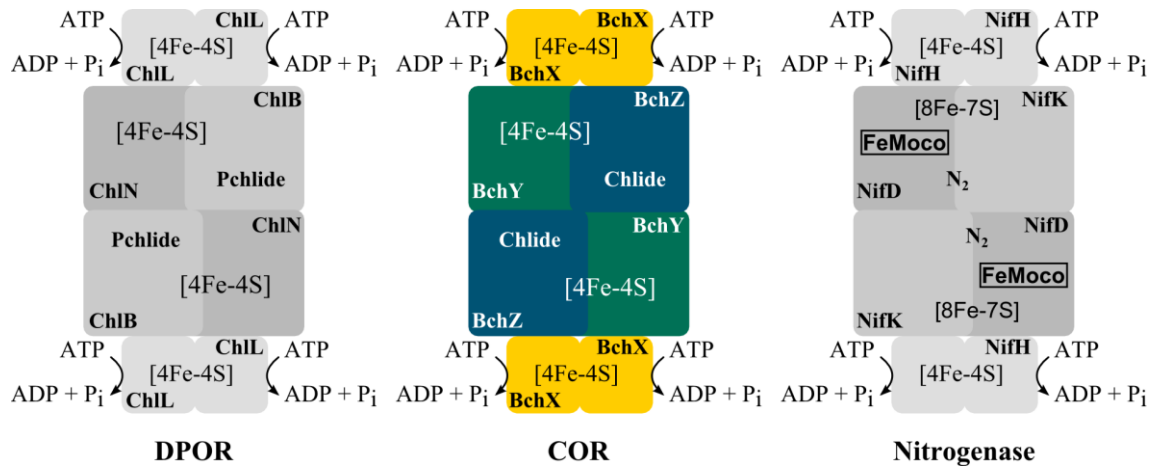


Abbildung 8: Vergleich der Untereinheiten von COR, DPOR und Nitrogenase.

Die ATP-anhängigen Enzymkomplexe der DPOR, COR und Nitrogenase katalysieren die Reduktion von Chlide, Pchlde und N_2 . Der DPOR- und Nitrogenase-Reaktionsmechanismus beinhaltet die transiente Bildung der oktameren Komplexe $(ChL)_2(ChlN/ChlB)_2(ChlL)_2$ oder $(NifH)_2(NifD/NifK)_2(NifH)_2$ (Moser *et al.*, 2013; Schindelin *et al.*, 1997). An der Reaktion beteiligte Redox-Cluster ([4Fe-4S] und [8Fe-7S]) und Kofaktoren (FeMoco) sind gezeigt. Orthologe Untereinheiten der DPOR und Nitrogenase sind durch unterschiedliche Grau-Färbung hervorgehoben. Der oktamere COR-Komplex wurde aufgrund der Sequenzähnlichkeiten zur DPOR und Nitrogenase erstellt.

Die COR-Untereinheiten zeigen starke Homologien, sowohl zur Nitrogenase als auch zur DPOR. Sequenzalignments der BchX-Untereinheit mit der BchL/ChlL-Untereinheit der DPOR zeigen eine hohe Sequenzidentität von 33% (Abbildung 8). Dagegen zeigen BchY und BchZ geringere Sequenzidentität zur BchN/ChlN- und BchB/ChlB-Untereinheit (15-18 % und 11-22 %) (Burke *et al.*, 1993b; Wätzlich *et al.*, 2009). Die Sequenzidentitäten der drei COR-Untereinheiten zur Nitrogenase verhalten sich ähnlich. BchX hat eine 30-37 %ige Aminosäure-Sequenzidentität zur NifH-Untereinheit (Burke *et al.*, 1993a). Die beiden anderen Untereinheiten BchY und BchZ haben eine geringere Ähnlichkeit (13-15 % und 11-16 %) zu den homologen NifD- und NifK-Untereinheiten (Fujita & Bauer, 2003; Wätzlich *et al.*, 2009).

Mit Hilfe der analytischen Gelpermeationschromatographie (GPC) wurde sowohl für die BchX-Untereinheit als auch für die ChlL- und NifK-Untereinheit eine dimere Struktur gezeigt (Abbildung 8; Georgiadis *et al.*, 1992, Nomata *et al.*, 2006a). Die Cystein-Reste, welche den [4Fe-4S]-Cluster in $(ChlL)_2$ als auch in $(NifH)_2$ koordinieren, sind auch in der BchX-Untereinheit der COR hoch konserviert (Cys-130 und Cys-165; *R. capsulatus* Nummerierung). Eisenbestimmungen für BchX gaben hierbei erste Hinweise auf einen analogen [4Fe-4S]-Cluster. Es wurde 2.7 mol Eisen/mol $(BchX)_2$ bzw. 3.4 mol Eisen/mol

(BchX)₂ für die gereinigten Proteine aus *Chlorobaculum tepidum* bzw. *R. denitrificans* erhalten (Wätzlich *et al.*, 2009). Zum Teil wurden diese Ergebnisse mit Hilfe von EPR-Experimenten unterstützt. In einer Studie wurde ein EPR-Signal für (BchX)₂ aus *R. sphaeroides* detektiert. Diese wurde entweder als ein einfacher [4Fe-4S]¹⁺-Cluster in (BchX)₂ oder alternativ als [2Fe-2S]¹⁺-Cluster (je einem Monomer) interpretiert (Kim *et al.*, 2008). Die an der ATP-Bindung beteiligten Aminosäuren sind ebenfalls hoch konserviert (Gly-42 – Ser-49; *R. capsulatus* Nummerierung) (Burke *et al.*, 1993a). Diese Sequenz-Untersuchungen weisen auf eine mögliche ATP-abhängige Reduktase-Aktivität der BchX-Untereinheit hin, analog wie auch für das Fe-Protein der Nitrogenase oder aber für die (ChlL)₂-Untereinheit der DPOR (Burke *et al.*, 1993b). Das (BchX)₂-Protein aus *R. denitrificans* oder aus *C. tepidum* ist in der Lage, das (BchL)₂-Protein zu ersetzen. Für die chimären Enzymkomplexe (BchX)₂(BchN/BchB)₂(BchX)₂ konnte eine deutliche DPOR-Aktivität nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der analytischen GPC wurde für die BchY- und BchZ-Untereinheit der COR eine heterotetramere Struktur gezeigt (Wätzlich, 2009). Sequenzalignments von BchY und BchZ mit den homologen Untereinheiten der DPOR und Nitrogenase zeigen, dass die möglichen Liganden für einen potenziellen [4Fe-4S]-Cluster den Liganden der Redox-Cluster der Nitrogenase oder der DPOR ähneln. In der BchY-Untereinheit der COR befinden sich drei konservierte Cystein-Reste in Analogie zu den Cystein-Liganden in ChlN bzw. in NifD. In der BchZ-Untereinheit ist ein weiterer Cystein-Rest hoch konserviert. Das entsprechende Cystein ist auch im P-Cluster von NifK der Nitrogenase und im [4Fe-4S]-Cluster des homologen Gerüstproteins NifN konserviert. Die ChlB-Untereinheit der DPOR besitzt an dieser Stelle einen Aspartat-Liganden (Bröcker *et al.*, 2010a; Fujita & Bauer, 2003). Diese Sequenzuntersuchungen zeigen, dass (BchY/BchZ)₂ ebenfalls einen oder mehr Redox-Cluster besitzt. In einer Studie von Kim *et al.* (2008) wurde für BchY und (BchY/BchZ)₂ von *R. sphaeroides* ein schwaches EPR-Signal eines [3Fe-4S]¹⁺-Clusters detektiert. Jedoch wird diese Art von Cluster häufig unter nicht physiologischen Bedingungen beobachtet. In dieser Studie wurde zudem vorgeschlagen, dass die BchZ-Untereinheit einen Häm-Kofaktor trägt, jedoch gibt es hierzu keine weiteren Hinweise in der Literatur (Kim *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde beschrieben, dass die COR Superoxide bei geringer Sauerstoff-Konzentration bildet (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

In vitro Aktivitätstests mit den gereinigten COR-Untereinheiten aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* bestätigten die Annahme, dass die Reduktion von Chlide zu Bchl_a durch die COR katalysiert wird (Kim *et al.*, 2008; Nomata *et al.*, 2006b). Nomata *et al.* (2006b) untersuchten mit Hilfe einer Flüssigkeitschromatographie und anschließender Massenspektrometrie das Produkt aus diesem *in vitro* Aktivitätstest. Sie bestätigten Bchl_a als direktes Produkt. Neben Natriumdithionit (NDT) als Elektronendonator benötigte der *in vitro* COR-Aktivitätstest eine anaerobe Umgebung, da die enthaltenen [Fe-S]-Cluster sauerstoffsensitiv sind. Der natürliche Elektronendonator könnte möglicherweise Ferredoxin sein (Nomata *et al.*, 2006b). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die COR ein ähnlicher, katalytischer Reaktionsmechanismus im Vergleich zur DPOR vermutet (Abbildung 8, Wätzlich *et al.*, 2009).

In der Literatur werden zwei mögliche Reihenfolgen für die stereospezifische Reduktion der C-7/C-8-Doppelbindung und die Hydroxylierung am C-3-Atom des Chlides vorgeschlagen (Abbildung 3). Sowohl Chlide als auch Hydroxyethyl-Chlorophyllid werden von der COR erkannt und am B-Ring reduziert (Biel & Marrs, 1983; Bollivar *et al.*, 1994; Pudek & Richards, 1975). Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen zur Substratspezifität der COR überein. Experimente mit verschiedenen chemisch modifizierten Substratmolekülen zeigten, dass Modifikationen am A-, C- und E-Ring von der COR toleriert werden, wohingegen die COR mit Veränderungen an der Propionat-Gruppe am C-17-Atom keine Aktivität mehr zeigte (Wätzlich, 2009).

In kürzlich veröffentlichten Studien wurde gezeigt, dass die COR aus verschiedenen anoxygenen, phototrophen Bakterien neben der Fähigkeit, die Doppelbindung des B-Ringes zu reduzieren, auch Divinyl-Reduktase-Aktivität besitzt (Abbildung 9) (Harada *et al.*, 2014; Tsukatani *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2014).

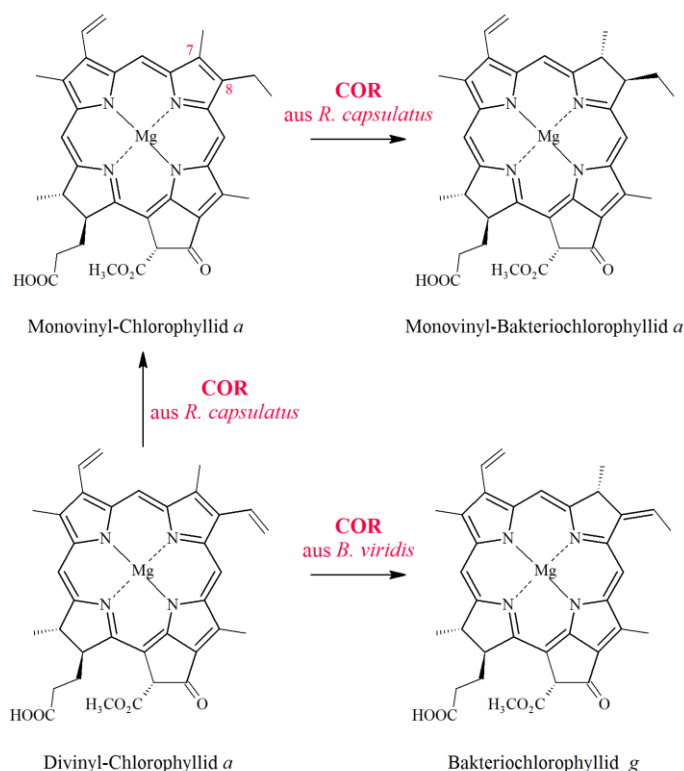


Abbildung 9: Divinyl-Reduktase-Aktivität der COR.

Die COR aus *R. capsulatus* katalysiert die Reduktion der C-7/C-8-Doppelbindung von Monovinyl-Chlorophyllid *a* zu Monovinyl-Bakteriochlorophyllid *a*. Außerdem katalysiert sie die Divinyl-Chlorophyllid *a* Reduktion zu Monovinyl-Chlorophyllid *a*. In der Biosynthese von Bchl *b* reduziert die COR in *B. viridis* Divinyl-Chlorophyllid *a* zu Bakteriochlorophyllid *g* (modifiziert nach Tsukatani *et al.*, 2013 und Yamamoto *et al.*, 2014).

Die COR aus *Blastochloris viridis* ist im Biosyntheseweg für Bchl *b* in der Lage, Divinyl-Chlorophyllid in Bakteriochlorophyllid *g* zu reduzieren (Tsukatani *et al.*, 2013). Daneben wurde für die COR aus *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* beschrieben, dass sie neben der Reduktion der C-7/C-8-Doppelbindung auch die Reduktion von Divinyl-Chlorophyllid in Monovinyl-Chlorophyllid katalysieren kann (Harada *et al.*, 2014; Tsukatani *et al.*, 2013). In einer weiteren Studie wurden diese unterschiedlichen Substratspezifitäten und katalysierten Reaktionen erneut untersucht. Durch Überexpression der COR-Gene von *B. viridis* in verschiedenen *R. sphaeroides* Mutanten-Stämmen wurde die Substratspezifität der COR aus *B. viridis* bestätigt. Zusätzlich wurde auch für die COR aus *R. sphaeroides* Divinyl-Reduktase-Aktivität nachgewiesen (Tsukatani *et al.*, 2015).

Die Fähigkeit, andere Reaktionen zu katalysieren, ist auch für die Nitrogenase bekannt. Diese reduziert nicht nur N_2 , sondern auch C_2H_2 , C_2H_4 , CN^- , N_2O , NO_2^- , N_3^- oder N_2H_4 (Hu & Ribbe, 2015; Yamamoto *et al.*, 2014).

1.7 Zielsetzung

Im Rahmen der Biosynthese von Bchl *a* reduziert die COR die C-7/C-8-Doppelbindung von Chlide. Diese Dissertation hatte zum Ziel, die für diese Katalyse notwendige Interaktion der (BchX)₂-Untereinheit mit dem katalytischen (BchY/BchZ)₂-Subkomplex aus dem Purpurbakterium *R. denitrificans* nachzuweisen und die an der Reaktion beteiligten [Fe-S]-Cluster der COR-Subkomplexe zu charakterisieren.

Zunächst sollten mit Hilfe von einem Interaktions-Experiment in Anwesenheit des ATP-Analogons, MgADP·AlF₄⁻ die Wechselwirkung der COR-Untereinheiten gezeigt werden. Des Weiteren sollten die [Fe-S]-Cluster der drei Untereinheiten biochemisch und spektroskopisch analysiert werden. Anschließend sollten mittels ortsgerichteter Mutagenese und *in vitro* Aktivitätstests die am Aufbau des [Fe-S]-Clusters in der (BchY/BchZ)₂-Untereinheit beteiligten Liganden identifiziert werden. Weitergehend sollte durch ein Mutageneseexperiment das DPOR-typische Liganden-Muster auf (BchY/BchZ)₂ übertragen werden. Diese mutagenisierten Untereinheiten sollten ebenfalls biochemisch und spektroskopisch untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

In dieser Arbeit sind die in Tabelle 2 aufgelisteten Geräte eingesetzt worden.

Tabelle 2: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Anaerobenkammer	Type B flexible vinyl chamber	COY Laboratory Products Inc.
	MACS-MG-1000 anaerobic workstation	dw scientific
Anaerobisierungsanlage	-	Eigenbau
Autoklav	LVSA 50/70	Zirbus Technologies
Blotapparatur	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad
EPR-Kryostat	ESR 900 helium flow cryostat	Oxford
EPR-Resonator	4102ST	Bruker
EPR-Spektrometer	Elexsys E-500 CW X-band	Bruker
FPLC-Anlage	ÄKTA Purifier	GE Healthcare
Filtrationsanlage	Glas-Vakuumfiltrationsgerät	Sartorius AG
French® Press	French® Pressure Cell Press	Thermo Electron Corporation
	French® Pressure Cell FA-032	SLM Aminco
Gefrierschrank (-80 °C)	VIP series -86 °C	SANYO
Geldokumentationssysteme	DeVision G System	Decon Science Tec
	Geldokumentation Felix 1050 DH-50	biostep®
Gelelektrophoresekammern	Agagel Mini	Biometra
	Mini-Protean® 3 cell	Bio-Rad
Inkubator	OV5	Biometra
Magnetrührer	VS-C7	VWR
	MR2002	Heidolph
	Ikamag® Reo	Drehzahl Electronic
Mikroskop	Digital Microscope VHX-500F	Keyence
Netzgerät	PowerPac300	Bio-Rad
	Standard Power Pack P25	Biometra
pH-Messgerät	CG 842	Schott

Gerät	Modell	Hersteller
Photometer	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie
	Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia Biotech
	V-650 Spectrophotometer	Jasco
Pipetten	Reference® und Research® Plus	Eppendorf
	Discovery comfort 10 mL	HTL Lab Solutions
Pipettierroboter	Honeybee®	Digilab
Proteinkonzentrierung	Amicon Rührzelle Modell 8010	Millipore
Reinstwasseranlage	Milli-Q Synthesis A 10	Millipore
Rollinkubator	RM 5	Assistent
Rotationsverdampfer	VV2000	Heidolph Instruments
Schüttler	3020	GFL
	TR-150	Infors AG
Speed vac®	Concentrator 5301	Eppendorf
Thermocycler	Tpersonal	Biometra
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschallbad	Ultraschallbad	Merck eurolab
Ultrazentrifuge	Optima™ L-90K Rotoren: 45 Ti und SW 70.1 Ti	Beckman Coulter
Vortex	Agitateur Top-Mix 1118	Bioblock Scientific
Waagen	BP61S Feinwaage	Sartorius
	BL1500	Sartorius
	SBA 52 Waage	Scaltec
Zentrifugen	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
	Avanti J-E	Beckman Coulter
	Centrifuge 5804	Eppendorf
	Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific
	MiniSpin	Eppendorf

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel

Die in den verschiedenen Versuchen eingesetzten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Applichem, Gerbu, Fisher, Fluka, Merck, Riedel de Haën, Roche, Roth, Serva, Sigma-Aldrich und VWR bezogen. Der Reinheitsgrad der Chemikalien entsprach, wenn nicht anders angegeben, „*pro analysi*, p.a.“. Für die Herstellung verschiedener Lösungen wurde deionisiertes Wasser eingesetzt. Die in Tabelle 3 angegebenen Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel wurden für die verschiedenen Experimente in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Hilfsmittel.		
Anwendung	Produkt	Hersteller
Blotten	WESTRAN® PVDF Protein Transfer und Sequencing Membrane	Schleicher & Schuell
	Blotting Paper Sheets	Munktell & Filtrak GmbH
Chemikalien	Ampicillin	Roth
	L-Ascorbinsäure Natriumsalz	Fluka
	ATP (Dinatriumsalz-Hydrat)	Sigma-Aldrich
	Bathophenanthrolindisulfonsäure Dinatriumhydrat	Sigma-Aldrich
	Bradford Reagent	Sigma-Aldrich
	Chloramphenicol	Roth
	Creatinphosphat	Sigma-Aldrich
	Eisen (III) Citrat	Fluka
	Eisenstandard for AAS	Fluka
	Imidazol	Sigma-Aldrich
	Instant Blue™	Expedeon
	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu
	L-Cysteinhydrochlorid	Roth
	L-Glutathion (reduziert)	Roth
	ADP (Natriumsalz)	Sigma Aldrich
	Natriumdithionit	Roth
	Ponceau S	Fluka
	Rotiphorese® Gel 30	Roth
	SDS	Roth
	Tetracyclin	Roth
Dialyse	Silde-A-Lyzer® G2 Dialysis Cassette, MWCO: 10 kDa	Thermo Scientific
	Slide-A-Lyzer® Mini Dialysis-Unit MWCO: 10 kDa	Thermo Scientific
Enzyme	BamHI HF (R3136S)	New England BioLabs
	Benzonase® Purity Grade II (> 90 %)	Merck
	Albumin Fraktion V/Rinderserumalbumin (BSA, engl. <i>bovine serum albumin</i>)	Roth
	Creatinphosphokinase	Sigma-Aldrich
	PreScission™ Protease	GE Healthcare
	RNase A	Sigma-Aldrich
	T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
	XhoI (R0146S)	New England Biolabs
Filter	Filtropur S (Ø 0.2 µm)	Sarstedt
	Rotilabo Spritzenfilter PVDF 0.45 µm	Roth
	Cellulose Acetat Filter 0.45µm	Sartorius Stedim Biotech

Anwendung	Produkt	Hersteller
Kits	Gel Filtration Molecular Weight Marker Kit for Molecular Weights 12-200 kDa	Sigma-Aldrich
	Gel Filtration Marker Kit for Protein Molecular Weights 29-700 kDa	Sigma-Aldrich
	QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen®
	QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen®
	QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Küvetten	Halb-Mikro-Küvetten, PS	Sarstedt
	Halb-Mikro-Küvette, Quarzglas SUPRASIL® Typ Nr. 104.002-QS, 10 mm	Hellma
	Halb-Mikro-Küvette, Quarzglas SUPRASIL® Typ Nr. 105.202-QS, 10 mm	Hellma
PCR	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	New England Biolabs
	Oligonukleotide	Biomers.net
Proteinkonzentrierung	Amicon® Ultra-0.5 mL, MWCO: 10 kDa	Millipore
	Ultrafiltration Membranes (Polyethersulfone) PBTk Ø 25 mm, MWCO: 30 kDa	Millipore
	Ultrafiltration Membranes (Regenerated Cellulose) PLTK Ø 25 mm, MWCO: 30 kDa	Millipore
Säulen	Poly-Prep® Chromatography Column 0.8 x 4 cm	Bio-Rad
	Econo-Pac® Chromatography Column 1.5 x 12 cm	Bio-Rad
	illustra NAP-5 und 25 Columns	GE Healthcare
	Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge	Waters
	Superdex 200 HR 10/30	GE Healthcare
	Leersäule 2.5 x 10 cm Fritte P2	Ochs Glasgeräte
	Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
Säulenmaterialien	CM-Sepharose CL-6B	Pharmacia Biotech
	Protino® Glutathion	Macherey-Nagel
	Agarose 4B	
Standards	S-protein Agarose	Merck Millipore
	Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific
	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
	Gene Ruler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific
Sonstiges	EPR-Quarz-Röhrchen Ø 5 mm	QSIL GmbH
	Sterile Kanülen (Ø 1.20 x 40 mm)	Braun

Anwendung	Produkt	Hersteller
	PU-Schaumstopfen 50 x 50 mm	Fisher Scientific

2.1.3 Bakterienstämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH10B TM	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i>	invitrogen TM (Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> BL21 (λ DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ(DE3)	Stratagene (Studier <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> BL21 CodonPlus [®] (DE3)- RIL	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> <i>Hte</i> [<i>argU ileY</i> <i>leuW</i> Cam ^r]	Stratagene (Jerpseth <i>et al.</i> , 1998)
<i>R. capsulatus</i> ZY5	F108::Km ^r <i>rif</i> -10, akkumuliert Pchl _{ide}	(Yang & Bauer, 1990)
<i>R. capsulatus</i> CB1200	<i>bchF</i> <i>orf490</i> :: ΩSp ^r <i>rif</i> -10, akkumuliert Chl _{ide}	(Bollivar <i>et al.</i> , 1994)

Die in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide sind in Tabelle 5 verzeichnet.

Tabelle 5: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pACYC-Duet-1	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, zwei MCS jeweils unter Kontrolle eines T7 Promotors, 1. MCS N-terminaler His-Tag, Cam ^r	Novagen [®] (Tolia & Joshua- Tor, 2006)
pACYC- <i>bchYZ</i>	pACYCDuet-1 Vektor mit dem <i>bchY</i> Gen aus <i>R. denitrificans</i> mit N-terminaler PreScission TM - Schnittstelle in den <i>SacI/NotI</i> Restriktionsschnittstellen der ersten MCS und dem <i>bchZ</i> Gen aus <i>R. denitrificans</i> in den <i>NdeI/XhoI</i> Restriktionsschnittstellen der zweiten MCS	(Dannheim, 2011)
pACYC- <i>bchYC62AZ</i>	pACYC- <i>bchYZ</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Cys-62 gegen Ala in BchY	diese Arbeit
pACYC- <i>bchYC86AZ</i>	pACYC- <i>bchYZ</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Cys-86 gegen Ala in BchY	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pACYC- <i>bchYC87AZ</i>	pACYC- <i>bchYZ</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Cys-87 gegen Ala in BchY	diese Arbeit
pACYC- <i>bchYC145AZ</i>	pACYC- <i>bchYZ</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Cys-145 gegen Ala in BchY	diese Arbeit
pACYC- <i>bchYZD30C</i>	pACYC- <i>bchYZ</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Asp-30 gegen Cys in BchZ	diese Arbeit
pACYC- <i>bchYZC35A</i>	pACYC- <i>bchYZ</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Cys-35 gegen Ala in BchZ	diese Arbeit
pACYC- <i>bchYZC35S</i>	pACYC- <i>bchYZ</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Cys-35 gegen Ser in BchZ	diese Arbeit
pACYC- <i>bchYZC35D</i>	pACYC- <i>bchYZ</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Cys-35 gegen Asp in BchZ	diese Arbeit
pACYC- <i>bchYZS94C</i>	pACYC- <i>bchYZ</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Ser-94 gegen Cys in BchZ	diese Arbeit
pACYC- <i>bchYZC35D/S94C</i>	pACYC- <i>bchYZS94C</i> abgeleitetes Plasmid, Austausch von Cys-35 gegen Asp in BchZ	diese Arbeit
pET32a	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, N-terminaler Thioredoxin/His ₆ /S-tag; T7 Promoter; Amp ^r	Novagen® (LaVallie <i>et al.</i> , 1993)
pET- <i>bchX</i>	pET32a Vektor mit dem <i>bchX</i> Gen aus <i>R. denitrificans</i> in den <i>SacI/XhoI</i> Restriktionsschnittstellen	(Wätzlich, 2009)
pGEX-6P-1	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, N-terminaler GST-Tag, PreScission™ Protease Schnittstelle, tac Promotor, Amp ^r	GE Healthcare (Smith & Johnson, 1988)
pGEX- <i>bchX</i>	pGEX-6P-1 Vektor mit dem <i>bchX</i> Gen aus <i>R. denitrificans</i> in den <i>BamHI/XhoI</i> Restriktionsschnittstellen, ausgehend vom pET- <i>bchX</i> Vektor	diese Arbeit
pGEX- <i>bchNBL</i>	pGEX-6P-1 Vektor mit dem <i>bchNBL</i> Operon aus <i>C. tepidum</i> in den <i>BamHI/XhoI</i> Restriktionsschnittstellen, RBS von <i>bchB</i> und <i>bchL</i> für <i>E. coli</i> optimiert	(Ganskow, 2006)
pRKISC	pRK145 Vektor mit dem <i>isc</i> Gen-Cluster (<i>iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx</i>) aus <i>E. coli</i> , Tet ^r	(Nakamura <i>et al.</i> , 1999)

2.1.4 Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese und die Sequenzierungen sind in Tabelle 6 dargestellt. Diese Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net synthetisiert oder aus dem Bestand der Arbeitsgruppe Jahn oder aber aus dem Bestand der Firma GATC Biotech AG verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide.

Die ausgetauschten Nukleotide für die ortsgerichteten Mutagenesen sind fett dargestellt.

Name	Sequenz (5'-3')
pACYCDuet_UP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG
Rd Y C62A Z for	CAAACCA CAAAGCATGGCT CCGGCGTTTCGGGTC
Rd Y C62A Z rev	GACCCGAACGCCGGAG CCATGCTTTGTGGTTTG
Rd Y C86A Z for	GAGCGGGTCGGCGG CCTGCGTCTATGGTC
Rd Y C86A Z rev	GACCATAGACGCAG GCCGCCGACCCGCTC
Rd Y C87A Z for	GCGGGTCGGCGTG GCCGCTCTATGGTCTG
Rd Y C87A Z rev	CAGACCATAGACG GCGCACGCCGACCCGC
Rd Y C145A Z for	GTGTGGACAAACCTT GCTGTGCCGACAGCC
Rd Y C145A Z rev	GGCTGTCCGCACAG CAAGGTTTGTACACCAC
Rd YZ D30C for	CAGGTCGTGATCT GCGGGCCCCGTGGGCTG
Rd YZ D30C rev	CAGCCACGGGGCCGCAGATCACGACCTG
Rd YZ C35A for	GGCCCCGTGGGCG CCGAAAACCTGCCCGTC
Rd YZ C35A rev	GACGGGCAGGTTTT TCGGCGCCACGGGGCC
Rd YZ C35S for	GGCCCCGTGGGCG ACGAAAACCTGCCCGTC
Rd YZ C35S rev	GACGGGCAGGTTTT TCGCTGCCACGGGGCC
Rd YZ C35D for	GGCCCCGTGGGCG ACGAAAACCTGCCCGTC
Rd YZ C35D rev	GACGGGCAGGTTTT TCGTCGCCACGGGGCC
Rd YZ S94C for	GTGGTCACCGGGT GCATTGCCGAGATGATCG
Rd YZ S94C rev	CGATCATCTCGGCAAT GCACCCGGTGACCAC
S-Tag Primer Nr: 38	CGAACGCCAGCACATGGACA

2.2 Sterilisation, Medien und Medienzusätze

Im folgenden Kapitel werden alle zur Anwendung gebrachten Medien und Medienzusätze behandelt. Falls nicht anders erwähnt wurden alle Substanzen in deionisiertem Wasser angesetzt.

2.2.1 Sterilisation

Die Sterilisation aller temperaturstabilen Medien, Lösungen und Gebrauchsmaterialien erfolgte durch Dampfsterilisation bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min. Alle hitzeempfindlichen Medienzusätze wurden mittels eines Filters der Porengröße 0.2 µm (Sarstedt) steril filtriert.

2.2.2 LB-Medium

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme erfolgte in LB-Medium (Bertani, 1951).

LB-Medium	Trypton aus Casein	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L

Vor der Sterilisation wurde für das entsprechende Festkulturmedium 15 g/L Agar-Agar zugegeben.

2.2.3 PY-Medium

Für den *R. capsulatus* Stamm ZY5 erfolgte die Anzucht in PY-Medium (Weaver *et al.*, 1975).

PY-Medium	Pepton aus Casein	3 g/L
	Hefeextrakt	3 g/L

Zur Herstellung des entsprechenden Festkulturmediums wurde vor der Sterilisation 15 g/L Agar-Agar hinzugefügt.

2.2.4 RCV 2/3 PY-Medium

Der *R. capsulatus* Stamm CB1200 wurde in modifizierten Malat-Minimalmedium (RCV 2/3 PY) kultiviert (Müller *et al.*, 2011).

RCV 2/3 PY-Medium	DL-Apfelsäure	4 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/L
	KH ₂ PO ₄	600 mg/L
	K ₂ HPO ₄	900 mg/L
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	200 mg/L
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	75 mg/L
	EDTA Dinatriumsalz	20 mg/L
	Thiaminhydrochlorid	0.1 mg/mL
	Spurenelement-Lösung	1 mL
	Peptone aus Casein	2 g/L
	Hefeextrakt	2 g/L
	D-Biotin	15 µg/L
Spurenelement-Lösung	H ₃ BO ₃	2.8 g/L
	MnSO ₄ ·H ₂ O	1.6 g/L
	NaMoO ₄ ·2 H ₂ O	752 mg/L
	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	240 mg/L
	Cu(NO ₃) ₂ ·3 H ₂ O	40 mg/L

Vor der Sterilisation wurde das Medium auf einen pH-Wert von 6.8 eingestellt und für das Festkulturmedium wurden 15 g/L Agar-Agar zugegeben.

2.2.5 Medienzusätze

Die genutzten Antibiotika und Medienzusätze in Tabelle 7 wurden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt. Die sterile Zugabe zum Medium erfolgte mit den angegebenen Endkonzentrationen.

Tabelle 7: Verwendete Medienzusätze.

Zusatz	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	dH ₂ O*	100 mg/mL	100 µg/mL
Chloramphenicol	100 % (v/v) Ethanol	34 mg/mL	34 µg/mL
Kanamycin	dH ₂ O*	50 mg/mL	5 µg/mL
Spectinomycin	dH ₂ O*	10 mg/mL	10 µg/mL
Tetracyclin	70 % (v/v) Ethanol	10 mg/mL	10 µg/mL
CaCl ₂	dH ₂ O	1 M	1 mM
L-Cysteinhydrochlorid	dH ₂ O*	100 mM	1 mM
Eisen(III)citrat	dH ₂ O	100 mM	1 mM
IPTG	dH ₂ O*	1 M	25-300 µM
MgSO ₄	dH ₂ O	1 M	1 mM
Tween 80	dH ₂ O*	10 % (w/v)	0.2 % (w/v)

*steril filtriert

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung verschiedener Bakterienstämme

Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* auf LB-Agar-Platten (2.2.2) erfolgte durch Ausstreichen einer Bakteriensuspension von 20-300 µL, die bei 37 °C über Nacht inkubiert wurde.

Für Flüssigkulturen von *E. coli* wurde LB-Medium (5-100 mL), ausgehend von einer Glycerin-Kultur oder einer Einzelkolonie einer LB-Agar-Platte, inokuliert. Die Inkubation des flüssigen Nährmediums mit entsprechenden Antibiotika und Medienzusätzen erfolgte für Volumina bis 10 mL in Reagenzgläsern. Größere Volumina wurden in 100-300 mL Schikanekolben über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. *E. coli* Hauptkulturen enthielten 500 mL LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika und Medienzusätzen. Die Kultivierung erfolgte nach Zugabe von 10 mL einer Vorkultur bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{578 nm} von 0.5 – 0.6 in 1 L Schikanekolben.

Kultivierung von *R. capsulatus* ZY5

Der Stamm *R. capsulatus* ZY5 weist einen Defekt in der Chl-Biosynthese auf, sodass die Chl-Vorstufe Pchl_{ide} akkumuliert. Die Kultivierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Fujita & Bauer (2000). Der Stamm wurde zunächst durch Ausstreichen einer Glycerin-Kultur auf einer PY-Agar-Platte mit 5 µg/µL Kanamycin kultiviert. Zusätzlich wurden 1 mM MgSO₄ und 1 mM CaCl₂ zum PY-Medium zugegeben (Weaver *et al.*, 1975). Dieses Festkulturmedium wurde für 1 bis 2 Tage bei 30 °C in Dunkelheit inkubiert.

Die Vorkultur von *R. capsulatus* ZY5 aus 50 mL PY-Medium mit 5 µg/µL Kanamycin, sowie 1 mM MgSO₄ und 1 mM CaCl₂ wurde mit einer Einzelkolonie einer PY-Agar-Platte inokuliert. Die Vorkultur wurde in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen horizontal rotierend (OV5, Biometra) für bis zu 3 Tage bei 34 °C in Dunkelheit kultiviert. Die Hauptkulturen, bestehend aus 600 mL PY-Medium in einem 1 L Erlenmeyerkolben mit den oben genannten Zusätzen, wurden mit 20 mL Vorkultur inokuliert und bei 34 °C im Dunkeln bei 130 rpm für 3 Tage inkubiert. Insgesamt wurden zwei Hauptkulturen angesetzt. Zur Adsorption des ins Medium abgegebenen Pchl_{ides} wurden jeweils 12 sterile Schaumstoffstücke (2.5 x 4 x 3 cm) zu jedem Kolben zugegeben (Heyes *et al.*, 2002).

Kultivierung von *R. capsulatus* CB1200

R. capsulatus C1200 besitzt einen Defekt der Chl-Biosynthese, wodurch es zu einer Anhäufung der Chl-Vorstufe Chl_{ide} kommt. Der Stamm wurde ähnlich der von Müller *et al.* (2011) beschriebenen Methode kultiviert. Der Stamm *R. capsulatus* CB1200 wurde, ausgehend von einer Glycerin-Kultur, auf eine RCV 2/3 PY-Agar-Platte (2.2.4) mit 10 µg/mL Spectinomycin unter Verwendung einer Petrischale ohne Nocken ausgestrichen. Die Zellen wurden bei 30 °C für 3 Tage in Dunkelheit inkubiert.

Für eine 50 mL Vorkultur in RCV 2/3 PY-Medium (2.2.4) wurden sämtliche Bakterienkolonien der Platte in Medium resuspendiert und als Impfmateriel verwendet. Die Kultivierung erfolgte in einem 100 mL Erlenmeyerkolben bei Dunkelheit, 180 rpm und 30 °C für 24 h. Zehn 45 mL Hauptkulturen wurden jeweils mit 5 mL Vorkultur inokuliert und wurden in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen im Dunkeln für weitere 3 Tage bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Dem RCV 2/3 PY-Medium mit 10 µg/ml Spectinomycin wurden zusätzlich 0.2 % Tween 80 (v/v) zugegeben.

2.3.2 Bestimmung von Zelldichten

Zur Zelldichtebestimmung wurde die optische Dichte bei 578 nm (OD_{578 nm}) photometrisch vermessen (Monod, 1949). Von Proben mit einer OD_{578 nm} ≥ 1 wurde eine entsprechende Verdünnung in dem jeweiligen Medium vermessen.

2.3.3 Lagerung von Bakterienzellen

Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerin-Kulturen durch Mischen von 1.2 mL Flüssigkultur mit 400 µL 80 %iger Glycerin-Lösung (w/v) hergestellt. Anschließend wurden die Zellen bei -80 °C gelagert (Mülhardt, 2009).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen

CaCl₂-Methode

Mit Hilfe einer CaCl₂-Lösung ist es möglich, die natürliche Kompetenz von *E. coli* zu steigern. CaCl₂ kompetente Zellen wurden nach dem modifizierten Protokoll von Cohen *et al.*, 1972 hergestellt. Dazu wurde 100 mL LB-Medium im 300 mL Schikanekolben mit einer Vorkultur von *E. coli* DH10, BL21 (λ DE3) oder BL21 CodonPlus®(DE3)-RIL 1:100 inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{578 nm} von 0.6. Nach Überführung der gesamten Kultur in sterile, eiskalte 50 mL Zentrifugenröhrchen wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 2'770 x g (Megafuge 1.0, Thermo Scientific) wurde das Zellpellet in 10 mL eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und 2'770 x g sedimentiert und in 1 mL eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert (110 µL) und bei -80 °C gelagert.

CaCl₂-Lösung	CaCl ₂	100 mM
	Glycerin	10 % (w/v)

RbCl-Methode

Auch durch die Verwendung von RbCl ist es möglich, die Kompetenz von *E. coli* künstlich zu steigern. RbCl kompetente Zellen wurden ähnlich der von Engler *et al.* (2008) beschriebenen Methode hergestellt. Die Inokulation von 250 mL LB-Medium erfolgte mit einer Vorkultur des *E. coli* Stammes DH10B im Verhältnis 1:100. Die Kultivierung erfolgte in einem 1 L Schikanekolben bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{578 nm} von 0.5 bis 0.6. Die Zellen wurden für 10 min bei 4 °C und 3'000 x g (Avanti J-E, Beckman Coulter) zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 100 mL eiskaltem TFB-I Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 4'500 x g (Centrifuge 5804) wurde das Zellpellet in 10 mL eiskaltem TFB-II Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation für 60 min auf Eis wurden die Zellen aliquotiert (100 µL) und bei -80 °C gelagert.

TFB-I Puffer	Kaliumacetat	30 mM
	CaCl ₂	10 mM
	MnCl ₂	50 mM
	RbCl	100 mM
	Glycerin	15 % (w/v)

Der Puffer wurde mit 1 M Essigsäure auf den pH-Wert 5.8 eingestellt und anschließend steril filtriert.

TFB-II Puffer	PIPES pH 6.0	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerin	15 % (w/v)

Der Puffer wurde mit 1 M KOH auf den pH-Wert 6.5 eingestellt und anschließend steril filtriert.

2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH10B mit verschiedenen transformierten Vektoren (Tabelle 5) in 5 mL LB-Medium, entsprechend den Beschreibungen in Kapitel 2.3.1, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für je 2 min bei 11'340 x g (Minispin, Eppendorf) bei Raumtemperatur (RT) sedimentiert. Die Präparation erfolgte unter Verwendung von zwei verschiedenen Versuchsvorschriften.

Bei der Isolierung der Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979) wurde das erhaltene Zellpellet in 300 µL P1-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 µL Puffer P2 und vorsichtigem Invertieren wurde die Suspension für 2 min bei RT inkubiert. Zum Ansatz wurden 300 µL P3-Puffer gegeben und vorsichtig gemischt. Dann wurde für 15 min bei 11'340 x g und RT zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µL Isopropanol versetzt. Nach starkem Mischen wurde die präzipitierte Plasmid-DNA durch Zentrifugation (15 min, 11'340 x g, RT) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 11'340 x g zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Sediment wurde bei 37 °C getrocknet und in 40 µL, auf 70 °C erhitztem, deionisiertem Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Alternativ wurde für eine anschließende Sequenzierung die Präparation der Plasmid-DNA mittels des „QIAprep® Spin Miniprep Kits“ (Qiagen) durchgeführt. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach den Angaben des Herstellers mit folgenden Änderungen durchgeführt. Die DNA wurde in 35 µL deionisiertem Wasser aufgenommen, welches zuvor auf 70 °C erhitzt wurde. Nach 10 minütiger Inkubation wurde die DNA von der Säule eluiert.

P1-Puffer	Tris-HCl pH 8.0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A-Lösung	100 µg/mL
P2-Puffer	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
P3-Puffer	Kaliumacetat pH 5.5	3 M

RNase A-Lösung	RNase A	10 mg/mL
	Glycerin	50 % (w/v)

Der P3-Puffer wurde mit Essigsäure auf den pH-Wert 5.5 eingestellt.

2.4.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbiert DNA ultraviolettes Licht (UV-Licht) (Mäntele, 2012). Somit können DNA-Konzentrationen photometrisch, z. B. mit Hilfe eines NanoDrops ND-1000 (PEQLAB) bestimmt werden. Hierzu wurden 2 µL einer DNA-Lösung eingesetzt. Deionisiertes Wasser wurde als Referenz vermessen. Dabei entsprach einer Absorption $A_{260\text{ nm}} = 1$ einer DNA-Konzentration von 50 µg/mL. Verunreinigende Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei $A_{280\text{ nm}}$. Über das Verhältnis $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ konnte die Reinheit einer Probe bestimmt werden. Eine reine DNA-Lösung ergibt einen Wert zwischen 1.8 bis 2.0 (Reineke, 2004).

2.4.4 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten DNA an spezifischen Erkennungssequenzen, wobei komplementäre Enden entstehen. DNA-Fragmente und Plasmide mit komplementären Enden können anschließend miteinander kombiniert werden (Arber & Linn, 1969).

Für den pGEX-*bchX* Vektor wurde das *bchX* Gen aus *R. denitrificans*, ausgehend vom pET-*bchX* Vektor (Tabelle 5), in die *Bam*HI/*Xho*I Restriktionsschnittstellen kloniert.

Für die Spaltung von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England BioLabs entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion erfolgte jeweils in 30 µL Ansätzen für 2 h bei 37 °C.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurden die linearisierten Plasmide und DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung durch die die Agarose-Gelmatix (Fuchs *et al.*, 2007).

DNA-Fragmente wurden mit 6-fach Ladepuffer gemischt und auf ein 1 %iges Agarose-Gel (w/v) aufgetragen. Zur Größenbestimmung diente der GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 110 V für ~45 min (Agagel, Biometra). Anschließend wurde das Gel für 20 min in einer 0.1 %igen Ethidiumbromid-Lösung (w/v) inkubiert. Durch Anregung des interkalierenden Ethidiumbromids mit UV-Licht bei 312 nm erfolgte die Visualisierung der DNA (DeVision G System, Decon Science Tec; Aaij & Borst, 1972).

6-fach Ladepuffer	Bromphenolblau	350 µM
	Xylen Cyanol FF	450 µM
	Glycerin	50 % (w/v)

TAE-Puffer	Tris-Acetat pH 8.0 EDTA	40 mM 1 mM
Agarose-Gel 1 % (w/v)	Agarose TAE-Puffer	1 g 100 mL
Ethidiumbromid-Lösung 0.1 % (w/v)	Ethidiumbromid dH ₂ O	1 µg 100 mL

2.4.6 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden diese nach der Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Reinigung unter Verwendung des „QIAquick® Gel Extraction Kits“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Zur anschließenden Elution wurde das Säulenmaterial mit 35 µL dH₂O bei 70 °C für 10 min inkubiert.

2.4.7 Ligation von DNA

Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase von der Firma New England BioLabs konnten die gespaltenen DNA-Fragmente und Plasmide verbunden werden. Hierbei kommt es zur Verknüpfung der 5'-Phosphat- mit dem 3'-Hydroxyl-Enden der komplementären DNA-Stränge (Wu & Wallace, 1989).

Nach Abschätzung der einzusetzenden Menge an Insert und Plasmid anhand eines Agarose-Gels erfolgte die Ligation entsprechend den Herstellerangaben. Zusätzlich wurden 5 mM ATP zum Reaktionsansatz gegeben. Die Reaktion erfolgte bei ~11 °C über Nacht.

2.4.8 Transformation von DNA

Die Aufnahme von Plasmid-DNA (nach einer Plasmid-Präparation oder aus einem Ligationsansatz) in chemokompetente *E. coli* Zellen (2.4.1) erfolgte mittels Hitzeschock (Van Die *et al.*, 1983).

Zu 1 µL Plasmid-DNA oder 10 µL eines Ligationsansatzes wurden 50-100 µL chemokompetente *E. coli* Zellen gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem 45 Sekunden andauernden Hitzeschock bei 42 °C wurden die Ansätze erneut für 2 min auf Eis gelagert. Zu den Zellen wurde 500 µL LB-Medium gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 600 rpm für 0.5-1 h (Thermomixer compact, Eppendorf) kultiviert. Nach dem Ausstreichen von 20-300 µL des Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Medienzusätzen wurden die Zellen bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.4.9 Ortsgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese lassen sich spezifisch einzelne oder mehrere Nukleotide austauschen, wodurch die Funktion der kodierten Aminosäure eines Enzyms aufgeklärt werden kann (Voet *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurden Mutationsanalysen für die COR-Untereinheiten BchY und BchZ durchgeführt. Der Austausch einzelner Aminosäuren erfolgte durch das „QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Agilent Technologies. Es wurden zwei komplementäre Oligonukleotide, die den entsprechenden Basenaustausch enthielten, synthetisiert (Tabelle 6). Während der PCR-Reaktion (Tpersonal, Biometra) lagern sich die Oligonukleotide an die Ausgangs-Plasmid-DNA an, woraufhin die *PfuUltra* HF DNA-Polymerase das Plasmid mit mutierter Gensequenz synthetisiert. Zum Abbau des Ausgangs-Plasmids wurde dem PCR-Ansatz die *DpnI* Endonuklease zugegeben. Dadurch wird spezifisch von *E. coli* methylierte DNA gespalten (Bauer *et al.*, 1998).

Die ortsgerichtete Mutagenese erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit den nachfolgenden Änderungen. Die Reaktion erfolgte in einem 25 µL Reaktionsansatz. Zusätzlich wurde die Oligonukleotidkonzentration um 20 % erhöht und 2-6 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (v/v) zugesetzt (Tabelle 8). Sowohl die Primer-Anlagerung als auch die Elongation erfolgte bei einer einheitlichen Temperatur von 68°C für 10 min.

Tabelle 8: Verwendetes Pipettierschema der ortsgerichteten Mutagenese.

Komponente	Menge
10-fach Reaktionspuffer	2.5 µL
Plasmid-DNA	12 ng
Oligonukleotid 1	75 ng
Oligonukleotid 2	75 ng
dNTP-Lösung	1 µL
100 % DMSO (v/v)	0.5 – 1.5µL
<i>PfuUltra</i> HF	0.5 µL
dH ₂ O	Auffüllen auf 25 µL

Für die Amplifikation der erhaltenen Plasmide mit der mutierten Gensequenz erfolgte eine Transformation mit 12.5 µl des PCR-Ansatzes in chemokompetente *E. coli* DH10B Zellen.

2.4.10 Sequenzierung von DNA

Mit Hilfe der Sequenziermethode nach Sanger wurden die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide (pGEX-*bchX*) bzw. die mutagenisierten Plasmide (Tabelle 5) analysiert (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Die Analyse der ermittelten Sequenzen erfolgte mit der Software Lasergene aus dem Programmpaket DNASTAR.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Rekombinante Proteinproduktion

Produktion der (BchY/BchZ)₂-Untereinheit der COR

Für die rekombinante Produktion der COR-Untereinheit (BchY/BchZ)₂ wurde das Plasmid pACYC-*bchYZ* in *E. coli* Zellen transformiert (2.4.8).

Die Kultivierung von *E. coli* BL21 (λ DE3) in 500 mL LB-Medium erfolgte entsprechend den Angaben in Kapitel 2.3.1. Dem Medium wurden 34 µg/mL Chloramphenicol zugegeben. Vor der Induktion mit 50 µM IPTG wurden zusätzlich 1 mM Eisen(III)citrat und 1 mM L-Cysteinhydrochlorid zur Optimierung der [Fe-S]-Cluster-Biosynthese hinzugefügt (Jaganaman *et al.*, 2007). Nach 4 h aerober Kultivierung bei 25 °C und 180 rpm wurden jeweils zwei Kulturen vereinigt. Anschließend wurden die Zellen für 45 min bei 17 °C in einer Anaerobenkammer (Type B flexible vinyl chamber, Coy Laboratories) statisch inkubiert (Bröcker *et al.*, 2008a). Alle weiteren Schritte erfolgten unter anaeroben Bedingungen (95 % N₂, 5 % H₂, <1 ppm O₂) mit N₂-gesättigten Lösungen und Puffern unter Verwendung von mit einem Septum verschließbaren Anaerobenflaschen.

Die Zellen wurden mittels Zentrifugation für 15 min bei 3'000 x g und 4 °C (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter) sedimentiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 15 mL Puffer A resuspendiert und bei -20 °C in einer Anaerobenflasche gelagert.

Zur Überprüfung der rekombinanten Produktionen wurde vor und nach der Induktion 1 mL Kultur entnommen und für 3 min bei 12'000 x g (Minispin, Eppendorf) zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde bis zur SDS-Analyse (2.6.2) bei -20 °C gelagert.

Sämtliche mutagenisierten (BchY/BchZ)₂-Proteinkomplexe wurden analog produziert.

Puffer A	HEPES/NaOH pH 7.5	100 mM
	MgCl ₂	10 mM
	NaCl	500 mM

Produktion der (BchX)₂-Untereinheit der COR

Für die rekombinante Produktion der COR-Untereinheit (BchX)₂ wurden die Plasmide pET-*bchX* oder pGEX-*bchX* in *E. coli* BL21 (λ DE3) Zellen transformiert (2.4.8).

Die Überproduktion von (BchX)₂ mit Hilfe des pET-*bchX* Vektors wurde grundsätzlich, wie in Wätzlich *et al.* (2009) beschrieben, durchgeführt. Zusätzlich enthielt der *E. coli* Stamm den Vektor pRKISC, welches das *isc*-Operon für die [Fe-S]-Cluster-Biosynthese in *E. coli* kodiert (Takahashi & Nakamura, 1999). Die Kultivierung von *E. coli* BL21 (λ DE3) in 500 mL LB-Medium erfolgte entsprechend den Angaben in Kapitel 2.3.1. Die rekombinante Proteinproduktion erfolgte in Gegenwart von 100 µg/mL Ampicillin und 10 µg/mL Tetracyclin. Die rekombinante Proteinproduktion wurde durch 300 µM IPTG induziert. Zusätzlich wurde dem Medium 1 mM Eisen(III)citrat und 1 mM L-Cysteinhydrochlorid zur Optimierung der [Fe-S]-Cluster-Biosynthese zugegeben (Jaganaman *et al.*, 2007). Nach 21 h aerober Kultivierung bei 17 °C und 160 rpm erfolgte

eine statische anaerobe Inkubation der Kulturen für 45 min. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation für 15 min bei 2'000 x g und 4 °C (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter) sedimentiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10 mL Puffer A mit 150 mM NaCl resuspendiert (Puffer B) und bei -20 °C in einer Anaerobenflasche gelagert.

Zur Überprüfung der rekombinanten Produktionen wurden, wie bei der rekombinanten Produktion von (BchY/BchZ)₂ beschrieben, vor und nach der Induktion Proben zur späteren SDS-Analyse (2.6.2) entnommen.

Die rekombinante Proteinproduktion von (BchX)₂ mit Hilfe des pGEX-*bchX* Vektors erfolgte analog zu der Herstellung von (BchY/BchZ)₂ unter Verwendung von 100 µg/mL Ampicillin. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation in Puffer B resuspendiert.

Produktion der (BchL)₂- und (BchN/BchB)₂-Untereinheiten der DPOR

Für die rekombinante Proteinproduktion der DPOR-Untereinheiten BchL, BchN und BchB aus *C. tepidum* wurde der pGEX-*bchNBL* Vektor (Ganskow, 2006) in *E. coli* BL21 CodonPlus[®](DE3)-RIL Zellen transformiert.

Die Überproduktion der drei Untereinheiten der DPOR erfolgte grundsätzlich wie in Bröcker *et al.* (2008a) beschrieben. Die Kultivierung von *E. coli* BL21 CodonPlus[®](DE3)-RIL in 500 mL LB-Medium erfolgte entsprechend den Angaben in Kapitel 2.3.1. Zusätzlich enthielt das Medium 1 mM Eisen(III)citrat und 1 mM L-Cysteinhydrochlorid zur Optimierung der [Fe-S]-Cluster-Biosynthese (Jaganaman *et al.*, 2007). Die rekombinante Proteinproduktion erfolgte in Gegenwart von 100 µg/mL Ampicillin und 34 µg/mL Chloramphenicol. Die rekombinante Proteinproduktion wurde durch 25 µM IPTG induziert. Nach 20 h aerober Kultivierung bei 17 °C und 160 rpm wurden die Kulturen 1.5 h statisch und anaerob inkubiert. Vor der Inkubation wurden 150 mg NDT zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 2'000 x g und 4 °C (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter) zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10 mL Puffer B und bei -20 °C in einer Anaerobenflasche gelagert.

Zur Überprüfung der rekombinanten Produktionen wurden, wie bei der rekombinanten Produktion von (BchY/BchZ)₂ beschrieben, vor und nach der Induktion Proben zur späteren SDS-Analyse (2.6.2) entnommen.

2.5.2 Zellaufschluss

Zum Aufschluss der Zellen, die das rekombinant produzierte Protein enthielten, wurde die Zellwand mit Hilfe einer gekühlten French[®] Press (Thermo Electron) zerstört. Die auftretenden Scherkräfte auf die Zellsuspension beim Öffnen des Kugelventils zerstören die Zellwand der Bakterien (Brookman, 1975; Chisti & Moo-Young, 1986).

Der Aufschluss der *E. coli* Zellen erfolgte in einem einfachen Durchgang bei 16'000 p.s.i in eine Anaerobenflasche. Anschließend wurde die lösliche Fraktion mittels Ultrazentrifugation (OptimaTM L-90K, Beckman Coulter) für 60-90 min bei 110'000 x g und 4 °C von den Zelltrümmern abgetrennt. Die Lagerung des zellfreien Extrakts erfolgte in Anaerobenflaschen bei -20 °C.

2.5.3 Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der hochspezifischen, reversiblen Adsorption eines Protein-Tags an einen spezifisch an eine Säulenmatrix gebundenen Liganden. Durch die Wechselwirkung kann das Zielprotein aus dem zellfreien Extrakt abgetrennt werden, wobei unspezifisch gebundene Makromoleküle durch verschiedene Waschschrte von der Säule entfernt werden können. Die anschließende Elution des Zielproteins kann durch kompetitive Verdrängung mit Hilfe des natürlichen Liganden erreicht werden (Lottspeich & Engels, 2006). In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche affinitätschromatographische Reinigungsschritte durchgeführt.

2.5.3.1 Affinitätschromatographie mittels Poly-Histidin-Tag

Für die Reinigung des Hexa-Histidin (His₆)-getaggtten BchY im Komplex mit BchZ (pACYC-*bchYZ*) und des Thioredoxin/Histidin₆/S (Trx/His₆/S)-getaggtten (BchX)₂ (pET-*bchX*) wurde eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt. Dabei bildet die kovalent an Sepharose immobilisierte, metallchelatbildende Iminodiessigsäure (IDA, engl. *iminodiacetic acid*) mit Ni²⁺-Ionen einen Komplex, wobei die Histidin-Reste des Tags noch an freie Koordinationsstellen binden können (Porath & Olin, 1983).

Der zellfreie Extrakt wurde zweimal auf eine Poly-Prep[®]-Säule (Bio-Rad) aufgetragen. Diese enthielt 1 mL Ni²⁺-beladene Chelating Sepharose FF (GE Healthcare). Für die Reinigung der (BchY/BchZ)₂-Untereinheit wurde Puffer A und für (BchX)₂ wurde Puffer B verwendet. Die Ni²⁺-IDA-Säule wurde mit 20 mL Puffer A oder Puffer B äquilibriert. Nach der Auftragung des zellfreien Extraktes (aus 2 L Zellkultur (BchY/BchZ)₂ oder 0.5 L Zellkultur (BchX)₂) folgte ein primärer Waschschrte mit 5 mL Puffer A oder Puffer B. Nach zwei Prä-Elutionen mit jeweils 2 mL Prä-Elutionspuffer A 1 und 1 mL Prä-Elutionspuffer A 2 wurde das rekombinante Fusionsprotein BchY im Komplex mit BchZ mit 1.5 mL, 0.5 mL und zweimal 1 mL Elutionspuffer A eluiert. BchX wurde schrittweise entsprechend mit Prä-Elutionspuffer B 1 und Prä-Elutionspuffer B 2 gewaschen und mit Elutionspuffer B eluiert.

Für die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR, engl. *electron paramagnetic resonance*, 2.6.7) enthielt eine Econo-Pac[®]-Säule (Bio-Rad) 7 mL Ni²⁺-beladene Chelating Sepharose FF (GE Healthcare). Um weitere unspezifisch gebundene *E. coli* Proteine zu entfernen, wurde das Reinigungsprotokoll verändert (GE Healthcare Bio-Science AB, 2009). Nach dem Äquilibrieren der Ni²⁺-IDA-Säule mit 140 mL Prä-Elutionspuffer A 2 oder B 2 wurden 20 mM Imidazol zum zellfreien Extrakt (aus 10 L Zellkultur) gegeben. Nach zweimaliger Auftragung des Extraktes folgten drei Waschschrte mit je 14 mL Prä-Elutionspuffer A 2 oder B 2, Prä-Elutionspuffer A 3 oder B 3 und 3.5 mL Elutionspuffer A oder B. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden anschließend mit 10.5 mL und zweimal 7 mL Elutionspuffer A oder B eluiert.

Die Reinigungen erfolgten unter anaeroben Bedingungen bei 17 °C. Nach Einfrieren mittels flüssigem N₂ wurden die Elutionsfraktionen bei -80 °C gelagert.

Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte durch Waschen mit zwei Säulenvolumen (S_v) 20 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA und 500 mM NaCl. Nach dem Waschen mit zwei S_v 6 M Guanidin-Hydrochlorid und 10 S_v dH₂O erfolgte die Beladung mit zwei S_v

100 mM NiSO₄. Anschließend wurde die Säule mit fünf Sv dH₂O gewaschen und in 20 % Ethanol (v/v) gelagert.

Prä-Elutionspuffer A 1 und B 1	Puffer A oder B Imidazol	10 mM
Prä-Elutionspuffer A 2 und B 2	Puffer A oder B Imidazol	20 mM
Prä-Elutionspuffer A 3 und B 3	Puffer A oder B Imidazol	25 mM
Elutionspuffer A oder B	Puffer A oder B Imidazol Glycerin	200 mM 10 % (w/v)

2.5.3.2 Affinitätschromatographie mittels GST-Tag

Das Glutathion-S-Transferase (GST)-getaggte (BchX)₂ wird mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Dabei werden die Wechselwirkungen des Tags mit Glutathion genutzt. Daneben ist Glutathion an Agarose immobilisiert (Walker & Rapley, 2008).

Der zellfreie Extrakt mit dem überproduzierten (BchX)₂ (pGEX-*bchX*) wurde auf 1 mL Protino® Glutathion Agarose 4B (Macherey-Nagel) in einer Poly-Prep®-Säule (Bio-Rad) gegeben. Zuvor erfolgte das Äquilibrieren der Säulenmatrix mit 20 mL Puffer B. Nach zweimaliger Auftragung des zellfreien Extraktes (aus 2 L Zellkultur) wurde die Säule mit 10 mL Waschpuffer gewaschen. Der GST-Tag wurde proteolytisch mit der PreScission™ Protease (200 U/mg in Waschpuffer; GE Healthcare) abgespalten. Dazu wurde die verschlossene Säule über Nacht bei 4 °C auf einem Rollinkubator (RM 5, Assistant) in einer Anaerobenflasche inkubiert. Die Elution erfolgte mit 1.5 mL und anschließend mit zweimal 1 mL Waschpuffer. Die Reinigungen wurden unter anaeroben Bedingungen bei 17 °C durchgeführt. Nach Einfrieren mittels flüssigem N₂ wurden die Elutionsfraktionen bei -80 °C gelagert.

Durch Waschen mit 10 mL 10 mM reduziertem Glutathion und 10 mM dH₂O wurde das Säulenmaterial regeneriert. Die Säulen wurden in 20 % Ethanol (v/v) gelagert.

Waschpuffer	Puffer B Glycerin	15 % (w/v)
--------------------	----------------------	------------

2.5.4 Gelpermeationschromatographie

Mit der Gelpermeationschromatographie (GPC) ist es möglich, Proteine nach ihrer nativen molekularen Masse aufzutrennen. Kleinere Proteine diffundieren leichter in die aus porösen, polymeren Kugeln mit definierter Porengröße aufgebaute Säulenmatrix. Sie haben im Vergleich zu größeren Proteinen eine längere Verweilzeit auf der Säule. Mit Hilfe einer Kalibrierung kann das Molekulargewicht des Zielproteins bestimmt werden.

Dabei ist die Molmasse der verwendeten Kalibrierungs-Proteine bekannt (Berg *et al.*, 2007).

Die GPC erfolgte mit einem FPLC-System (ÄKTA purifier, GE Healthcare) und wurde mit der UNICORN Control Software überwacht. Die analytische Größenbestimmung von (BchY/BchZ)₂ erfolgte unter Verwendung einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (GE Healthcare). Für das Äquilibrieren der Säule wurden drei Sv Puffer B verwendet. Die Auftrennung von 100 µL (BchY/BchZ)₂ mit einer Konzentration von etwa 9.6 mg/mL (aus der Affinitätschromatographie (2.5.3.1) erfolgte bei einer Flussrate von 0.5 mL/min über 1.4 Sv. Vor der Auftragung wurde die Probe für 10 min bei 12'000 x g (Minispin, Eppendorf) zentrifugiert. Während der chromatographischen Reinigung wurde die Absorption bei 280 nm detektiert. Die Kalibrierung wurde unter Verwendung des „Gel Filtration Molecular Weight Marker Kit for Molecular Weights 12-200 kDa“ und dem „Gel Filtration Marker Kit for Protein Molecular Weights 29-700 kDa“ der Firma Sigma-Aldrich nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Die Chromatographie erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 17 °C. Der verwendete Puffer wurde in doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O, Milli-Q Synthesis A 10; Millipore) hergestellt, durch 0.45 µm (Sartorius Stedim Biotech) filtriert, im Ultraschallbad (Merck eurolab) entgast und mit N₂ gesättigt.

2.5.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Bei der Ultrafiltration strömen kleine Moleküle durch die Membran, wobei Proteine auf der Membran konzentriert werden (Eckert & Kartenbeck, 1997).

Um die Konzentration von Proteinen zu erhöhen, wurden Zentrifugalkonzentratoren (Amicon®Ultra-0.5 mL, MWCO: 10 kDa, Millipore) oder eine Rührzelle unter N₂-Druck mit 3 bar (Modell 8010, Millipore) verwendet. Für die Rührzelle wurden Polyethersulfon-Membranen und regenerierte Zellulose (Tabelle 3) verwendet. Die Konzentrierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben und unter anaeroben Bedingungen bei 17 °C.

2.5.6 *In vitro* [Fe-S]-Cluster-Rekonstitution

Der [Fe-S]-Cluster in der (BchX)₂-Untereinheit wurde ähnlich zu der von Flühe *et al.* (2012) beschriebenen Methode *in vitro* chemisch rekonstituiert.

Die Rekonstitution erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 17 °C in einem Volumen von 4 mL. Ungefähr 100 µM (BchX)₂ wurde mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 4.5 mol Eisenammoniumcitrat/mol (BchX)₂ wurde der Ansatz 5 min inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 4.5 mol Lithiumsulfid/mol (BchX)₂ zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz über Nacht bei 4 °C auf einem Rollinkubator (RM 5, Assistent) in einer Anaerobenflasche inkubiert. Die Reaktion wurde durch einen Zentrifugationsschritt für 5 min bei 12'000 x g (Minispin, Eppendorf) und einer Entsalzung über eine illustra NAP-25 Gelpermeationschromatographie (GE Healthcare) nach den Herstellerangaben abgestoppt. Die Überprüfung einer erfolgreichen Rekonstitution erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie (2.6.5). Alle verwendeten Reagenzien wurden in Elutionspuffer B hergestellt.

2.6 Proteincharakterisierung

2.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine wurde die Methode von Bradford (1976) verwendet. Dabei bildet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 mit dem Protein einen Komplex, wodurch die Absorption des gebundenen Farbstoffs bei 595 nm photometrisch gemessen werden kann.

Zu 30 µL Proteinlösung wurde 1 mL Bradford Reagenz der Firma Sigma-Aldrich zugeben. Nach 10 min Inkubation bei RT erfolgte die Messung der Probe bei $A_{595 \text{ nm}}$. Verdünnungen wurden in dem entsprechenden Puffer hergestellt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Kalibrierung unter Verwendung von BSA im jeweils verwendeten Puffer durchgeführt.

2.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Größe im elektrischen Feld. Durch das Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) und β -Mercaptoethanol werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine zerstört und deren Eigenladung durch das negativ geladene SDS überdeckt. Es wurde die diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli (1970) verwendet. Das Agarosegel ist aus einem Sammelgel zur Verhinderung der Aggregation und Bildung schärferer Banden und einem Trenngel zur Auftrennung der Proteine aufgebaut. Das 12 %ige Trenngel wurde mit einem 6 %igen Sammelgel überschichtet (Lottspeich & Engels, 2006).

Zur Überprüfung der Proteinproduktion wurde 1 ml Zellkultur vor und nach der Induktion sedimentiert (2.5.1). Das erhaltene Zellpellet wurde in 50 µL dH₂O und 50 µL 2-fach SDS-Probenpuffer resuspendiert. Diese Proben wurden OD_{578 nm}-bereinigt aufgetragen, wobei eine OD_{578 nm} von 0.5 einem Auftragsvolumen von 10 µL entsprach. Zu Proben (20 µL), die im Laufe der Reinigung erhalten wurden, wurden 20 µL SDS-Probenpuffer zugegeben. Alle Proben wurden für 10 min bei 95 °C (Thermomixer compact, Eppendorf) inkubiert und für 10 min bei 12'000 x g (Minispinn, Eppendorf) zentrifugiert. 1-10 µL Probe und 7 µL der Proteinstandards (Unstained Protein Molecular Weight Marker oder PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific) wurden auf das Gel gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 45 mA für 35 min in der Mini-Protean® 3 cell von Bio-Rad.

Nach der Gelelektrophorese wurden die erhaltenen Proteinbanden für 1 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Entfärberlösung bis zur deutlichen Sichtbarkeit entfärbt. Zur schnellen Visualisierung wurden die Gele alternativ unter Verwendung von Instant Blue™ der Firma Expedeon nach den Herstellerangaben gefärbt. Zur Dokumentation wurde die Geldokumentation Felix 1050 DH-50 der Firma biostep® verwendet.

Rotiphorese® Gel 30	Acrylamid	30 % (w/v)
	Bisacrylamid	0.8 % (w/v)

6 % Sammelgel (w/v)	Rotiphorese® Gel 30	0.5 mL
	Tris/HCl pH 6.8 mit 0.4 % SDS (w/v)	0.625 mL
	dH ₂ O	1.375 mL
	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2.5 µL
	10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) (w/v)	25 µL
12 % Trenngel (w/v)	Rotiphorese® Gel 30	2 mL
	Tris/HCl pH 8.8 mit 0.4 % SDS (w/v)	1.25 mL
	dH ₂ O	1.75 mL
	TEMED	5 µL
	10 % APS (w/v)	50 µL
2-fach SDS-Probenpuffer	Tris/HCl pH 6.8	100 mM
	Glycerin	40 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	2 % (w/v)
	SDS	3.2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.2 % (w/v)
Elektrophoresepuffer	Tris/HCl pH 8.8	50 mM
	Glycin	385 mM
	SDS	0.1 % (w/v)
Coomassie-Färbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
	Ethanol	30 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue G-250	0.25 % (v/v)
Entfärberlösung	Essigsäure	10 % (v/v)
	Ethanol	30 % (v/v)

2.6.3 Western-Blotting

Beim Western-Blotting werden Proteine, die zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, quantitativ vom Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Die auf der Membran gebundenen Proteine können spezifisch durch Antikörper oder unspezifisch durch Farbreagenzien detektiert werden (Corley, 2004; Towbin *et al.*, 1979).

Nach der SDS-PAGE wurde das Polyacrylamid-Gel ohne Färbung für 15 min in Towbin-Puffer inkubiert. Die verwendete Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran (WESTRAN® PVDF Protein Transfer und Sequencing Membrane, Schleicher & Schuell) wurde zunächst mit 100 % Methanol für 15 min aktiviert und anschließend für 15 min in Towbin-Puffer inkubiert. Die Whatmanpapiere (neoLab) wurden ebenfalls in Towbin-Puffer inkubiert. Danach erfolgte die Übertragung mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) für 12 min bei konstanten 25 V nach den Angaben des Herstellers.

Für die N-terminale Sequenzierung der Proteine wurden die transferierten Proteine auf der PVDF-Membran unspezifisch mit Ponceau S-Lösung gefärbt (Slemmon *et al.*, 1980). Nach dem Waschen der Membran mit dH₂O wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und bei 4 °C gelagert. Zur Dokumentation wurde die Geldokumentation Felix 1050 DH-50 der Firma biostep[®] genutzt.

Towbin-Puffer	Tris/HCl pH 9.5	25 mM
	Glycin	192 mM
Ponceau S-Lösung	Ponceau S	0.2 % (w/v)
	Trichloressigsäure	3 % (w/v)
	Sulfosalicylsäure	3 % (w/v)

2.6.4 N-terminale Proteinsequenzierung

Für die Identifikation der gereinigten Proteine und die Quantifizierung der einzelnen Untereinheiten der COR wurde die von Edman *et al.* (1950) entwickelte Methode angewendet. Im automatisierten Edman-Abbau werden die Aminosäuren am N-terminalen Ende eines Proteins sukzessiv abgespalten und mittels Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) identifiziert (Edman *et al.*, 1950; Munk, 2008).

Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (2.6.2) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (2.6.3) übertragen. Nach anschließender Ponceau S-Färbung erfolgte die N-terminale Sequenzierung durch Beate Jaschok-Kentner am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung.

2.6.5 UV/Vis-Spektroskopie

Zur Identifikation extrahierter Tetrapyrrole und zur Charakterisierung der [Fe-S]-Cluster in den Untereinheiten der COR wurde die Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich (UV/Vis, *ultraviolet/visible*) verwendet.

Die Messung der Absorptionsspektren erfolgte mit Hilfe des V-650 Spektrometers der Firma Jasco. Extrahierte Tetrapyrrole wurden in einer Quarzglas SUPRASIL[®] Typ Nr. 104.002-QS Küvette (Hellma) bei 200 nm/min im Spektralbereich von 800-600 nm vermessen. Eine mit einem Stopfen verschlossene Quarzglas SUPRASIL[®] Typ Nr. 105.202-QS Küvette (Hellma) wurde unter anaeroben Bedingungen verwendet. Die Messung der gereinigten Proteine erfolgte bei 200 nm/min im Spektralbereich von 600-220 nm.

2.6.6 Bestimmung des Eisen-Gehaltes

Zur Charakterisierung der [Fe-S]-Cluster in den (BchX)₂- und (BchY/BchZ)₂-Untereinheiten der COR wurde der Eisen-Gehalt bestimmt. Durch Zugabe von Ascorbinsäure wird Fe(III) zu Fe(II) reduziert (Perry & San Clemente, 1977). Die

Bildung eines roten Farbkomplex aus Fe(II) und Bathophenanthrolin ermöglichen es, den Eisen-Gehalt eines Proteins zu ermitteln. Der gebildete Komplex kann anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 535 nm quantifiziert werden. Der Eisen-Gehalt wurde nach einer modifizierten Methode von Huberman & Pérez (2002) bestimmt.

Es wurde ein Probenvolumen von 65 µL (gereinigtes Protein oder Fe-Standardlösung, Fluka) eingesetzt. Für Verdünnungen wurde dH₂O verwendet und alle Messungen erfolgten in einer Doppelbestimmung. Die Fe-Standardlösungen enthielten 0 – 8 nmol Fe(II)-Ionen. Nach Zugabe von 45 µL 1 M Perchlorsäure, kräftigem Mischen (Agitateur Top-Mix 1118, Bioblock Scientific) und einer Inkubation für 15 min bei RT wurde die Probe für 5 min bei 6'700 x g (Minispin, Eppendorf) zentrifugiert.

Zu 90 µL des Überstands wurden 72 µL Bathophenanthrolindisulfonsäure-Dinatriumhydrat (1.7 mg/mL), 36 µL einer L-Ascorbinsäure-Lösung (38 mg/mL) und 27 µL von einer 1:3 verdünnten gesättigten Ammoniumacetatlösung nacheinander zugegeben. Nach kräftigem Mischen folgte eine Inkubation für 30 min bei RT. Der Ansatz wurde für 5 min bei 6'700 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bei 535 und 680 nm photometrisch vermessen (V-650, Jasco). Nach Abzug der Werte bei 680 nm wurde mit Hilfe der erstellten Kalibrierung der Fe-Gehalt im Protein berechnet.

2.6.7 Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie

Mit der Elektronenspinresonanz (EPR, engl. *electron paramagnetic resonance*)-Spektroskopie ist es möglich, „Information[en] über die Art, Struktur, Dynamik und lokale Umgebung [von] paramagnetischen Zentren [zu] erhalten“ (Lottspeich & Engels, 2006, S. 441). Mit der Methode der EPR-Spektroskopie wurden die [Fe-S]-Cluster der COR-Untereinheiten (BchX)₂ und (BchY/BchZ)₂ charakterisiert. [4Fe-4S]-Cluster besitzen paramagnetische Zentren und können durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes zwei Spin-Zustände einnehmen. Bei der EPR-Spektroskopie wird der Wechsel der Spin-Zustände durch elektromagnetische Strahlung in Form von Mikrowellen induziert. Bei Erfüllung der korrespondierenden Resonanzbedingung werden die Mikrowellen absorbiert. Daraus resultieren charakteristische Absorptionsspektren mit spezifischen g-Werten entsprechend der Lage der Absorptionslinie (Baltes, 2004; Lottspeich & Engels, 2006).

Die gereinigten oder rekonstituierten Proteine wurden bis zu einer Konzentration von 200 µM mit einer Rührzelle unter N₂-Druck mit 3 bar (2.5.5) in einer Anaerobenkammer (Type B flexible vinyl chamber, Coy Laboratories) konzentriert. Zur Reduktion der [Fe-S]-Cluster wurde 12.5 mM NDT zugegeben und der Ansatz wurde für 15 min bei 17 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Proben in EPR-Quarz-Röhrchen (Ø 5 mm, QSIL GmbH) und das Einfrieren mittels flüssigem N₂.

Die Messungen wurden von Dr. Edward Reijerse, Leiter der Arbeitsgruppe „Bio Hydrogen“ am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion (Mülheim an der Ruhr, Deutschland) durchgeführt.

Die X-Band-EPR-Spektren wurden mit einem Eleksys E-500 CW X-band Spektrometer (Bruker) aufgezeichnet. Nach Platzierung der Probe in einen Standard TE102 Resonator (4102ST, Billerica) erfolgten die Messungen bei 10-15 K mit Hilfe eines ESR 900 Heliumflusskryostaten (Oxford) bei 3-300 K. Durch Subtraktion des Hintergrundspektrums eines leeren EPR-Quarz-Röhrchens unter identischen Versuchsbedingungen wurde die Basislinie korrigiert. Die Auswertungen und

Simulationen der experimentellen Daten erfolgten mit der Software Kazan Viewer (MATLAB GUI), Easyspin (Stoll & Schweiger, 2006) und Matlab 2010a (MathWorks®).

2.6.8 Sequenzanalysen

Um die COR-Untereinheiten mit den homologen DPOR-Untereinheiten zu vergleichen, wurde eine Sequenz- und Struktur-basierte Analyse durchgeführt.

Für die DPOR-Untereinheiten von *P. marinus*, *R. sphaeroides*, *T. elongatus* und *R. capsulatus* wurde ein Struktur-basiertes Alignment erstellt. Dieses Alignment wurde mit Hilfe der Unterprogramme „MatchMaker“ und „MatchAlign“ aus dem Programmpaket UCSF Chimera (Meng *et al.*, 2006; Pettersen *et al.*, 2004) unter Verwendung der pdb-Dateien 2YNM, 3FWY, 2XDQ und 3AEK angefertigt. Weiterhin wurde jeweils ein Sequenz-basiertes Alignment ausgehend von 13–17 repräsentativen BchX- und BchL-, BchY- und BchN-, sowie BchZ- und BchB-Sequenzen mit Hilfe von ClustalW2 (Goujon *et al.*, 2010; Larkin *et al.*, 2007) berechnet. Abschließend wurden die Sequenz- und Struktur-basierten Alignments manuell zusammengefügt. Die konservierten Aminosäuren (Stern, Punkt und Doppelpunkt) wurden angegeben. Die in der Studie von Moser *et al.* (2013) ermittelten Aminosäuren, die an der Dimer-Schnittstelle von (BchL)₂ sowie an der (BchN/BchB)₂-Protein-Protein-Interaktion beteiligt sind, wurden im Alignment hervorgehoben. Weiterhin wurden auch die Aminosäuren dargestellt, die am dynamischen „Switch“-Mechanismus der BchL-Untereinheit beteiligt sind (Moser *et al.*, 2013). Zusätzlich wurde auch eine Sekundärstrukturvorhersage für die einzelnen COR-Untereinheiten unter Verwendung des Programms SOPMA kalkuliert (Combet, 2000).

Für die Sequenz-basierten Alignments von BchX und BchL, BchY und BchN, sowie BchZ und BchB wurden Proteinsequenzen der folgenden Stämme verwendet. Die verschiedenen Organismen wurden mit Hilfe einer BLAST-Suche und der „Microbial Genome Database“ ermittelt (Altschul *et al.*, 1990; Uchiyama *et al.*, 2015): *Chlorobium chlorochromatii*, *Chlorobium limicola*, *Chlorobaculum parvum*, *Chlorobium tepidum*, *Chlorobium phaeobacteroides*, *Chloroflexus*, *Brevundimonas subvibrioides*, *Bradyrhizobium*, *Dinoroseobacter shibae*, *Pelodictyon luteolum*, *Pelodictyon phaeoclathratiforme*, *Prosthecochloris aestuarii*, *T. elongatus*, *P. marinus*, *P. marinus* subsp. *pastoris*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodomicrobium vannielii*, *Mehtylobacterium radiotolerans*, *Jannaschia*, *R. capsulatus*, *Roseobacter litoralis*, *R. sphaeroides*, *R. denitrificans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rubrivivax gelatinosus*.

2.7 Enzymaktivitätstest

2.7.1 Herstellung von Pchlido

Der *R. capsulatus* Stammes ZY5 wurde wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben für drei Tage kultiviert. Die grün-gefärbten Schaumstoffstücke wurden getrocknet und Pchlido wurde mit 400 mL Aceton extrahiert. Alle verwendeten Lösungen wurden auf 4 °C temperiert. Zur Reinigung von Pchlido wurde eine mit CM-Sepharose CL-6B beladene Säule (Leersäule 2.5 x 10 cm Fritte P2, Ochs) mit 500 mL Aceton äquilibriert. Nach Zugabe des in Aceton gelösten Pchlido wurde mit 250 mL einer 5 %igen Methanol/96 %igen

Aceton-Lösung (v/v) gewaschen. Das Pchlidge wurde mit 100 mL einer 25 %igen Methanol-/75 %igen Aceton-Lösung (v/v) eluiert.

Die Pchlidge-Lösung wurde bei 350 mbar und 55 °C im Rotationsverdampfer (VV2000, Heidolph) eingeeengt. Anschließend wurde die tiefgrüne ölige Pchlidge-Lösung in 100 % DMSO aufgenommen (Heyes *et al.*, 2002). Die Konzentration von Pchlidge wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten von Pchlidge $\epsilon_{626\text{ nm}} = 30.4\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Fujita & Bauer, 2000) bestimmt. Es wurden 2 μL Pchlidge mit 498 μL Aceton gemischt. Die komplette Durchführung erfolgte in Dunkelheit. Die Pchlidge-Proben wurden bei -20 °C im Dunkeln gelagert.

2.7.2 Gekoppelter *in vitro* DPOR/COR-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Aktivität der rekombinant hergestellten Untereinheiten (BchX)₂ und (BchY/BchZ)₂ der COR wurde ein modifizierter, gekoppelter *in vitro* DPOR/COR-Aktivitätstests durchgeführt (Wätzlich, 2009).

Alle gekoppelten DPOR/COR-Aktivitätstests erfolgten in Dunkelheit und unter anaeroben Bedingungen in einer Anaerobenkammer bei 17 °C (Type B flexible vinyl chamber, Coy Laboratories). Der Aktivitätstest wurde in 250 μL Ansätzen in Puffer B, 2 mM ATP, 5 mM DTT, 0.7 mM Natriumdithionit (NDT) als Elektronendonator und 2.7-3.5 μM Pchlidge durchgeführt. Zusätzlich enthielt der Ansatz ein ATP regenerierendes System aus 20 mM Kreatinphosphat und 0.1 U/ μL Kreatinphosphokinase.

Zum Reaktionsansatz wurden 40-100 pmol gereinigtes (BchY/BchZ)₂ und 0.25-40 μL zellfreier Extrakt mit der überproduzierten (BchX)₂-Untereinheit zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde ergänzt mit 40 μL eines zellfreien Extraktes der rekombinant hergestellten DPOR-Untereinheiten BchL, BchN und BchB von *C. tepidum* (2.5.1). Die DPOR-Untereinheiten katalysieren die Reduktion von Pchlidge zum COR-Substrat Chlidge. Alle Ansätze wurden für 30 oder 60 min bei 34 °C (Thermomixer compact, Eppendorf) inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μL Aceton gestoppt. Nach zwei Zentrifugationsschritten für je 10 min bei 12'000 x g (Minispinn, Eppendorf) erfolgte der Nachweis von Pchlidge, Chlidge und Bchlidge durch UV/Vis-Spektroskopie (2.6.5). Dabei wurden die Extinktionskoeffizienten für Pchlidge $\epsilon_{626\text{ nm}} = 30.4\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Chlidge $\epsilon_{665\text{ nm}} = 74.9\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (McFeeters *et al.*, 1971) und Bchlidge $\epsilon_{734\text{ nm}} = 44.7\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Nomata *et al.*, 2006b) verwendet. Alle Aktivitätstests wurden durch Kontrollexperimente in Abwesenheit von (BchX)₂ oder (BchY/BchZ)₂ vervollständigt.

Die Aktivität der mutagenisierten (BchY/BchZ)₂-Untereinheiten wurde unter analogen Bedingungen bestimmt.

2.8 Bindungsassay

2.8.1 Herstellung von Chlidge

Der *R. capsulatus* Stamm CB1200 wurde wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben für drei Tage kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen für 30 min und 3'000 x g (Megafuge 1.0, Thermo Scientific) bei RT zentrifugiert. Nach Müller *et al.* (2011) wurden drei

aneinander gekoppelte Sep-Pak Plus C18 Säulen (Waters) verwendet. Die Säulen wurden mit 50 mL Methanol gewaschen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit RCV 2/3 PY-Medium (2.2.4) und 0.2 % Tween 80 (v/v) äquilibriert. Nach Zugabe des Überstandes wurde mit 10 mM Tricine pH 8.0 und 20 % Aceton (v/v) (15mL) gewaschen. Die Elution von Chlide erfolgte mit 100 % Aceton.

Die acetonische Lösung wurde mit Luft und N₂ eingengt und anschließend wurde die grüne ölige Chlide-Lösung in 100 % DMSO aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch UV/Vis-Spektroskopie und Mischen von 2 µL Chlide mit 498 µL Aceton. Die komplette Herstellung des Chlide wurde in Dunkelheit durchgeführt. Bis zur Verwendung wurde Chlide in Dunkelheit bei -20 °C gelagert.

2.8.2 Reinigung von Chlide-gesättigtem (BchY/BchZ)₂

Um die Bindung des Chlides an die (BchY/BchZ)₂-Untereinheit zu untersuchen, wurde eine Ko-Reinigung ähnlich der von Nomata *et al.* (2008) beschriebenen Methode zur Ko-Reinigung von Pchlde und (BchN/BchB)₂ der DPOR durchgeführt.

Für die Ko-Reinigung wurde das Reinigungsprotokoll der Affinitätsreinigung für 7 mL S_V (2.5.3.1) verwendet. Dabei erfolgte eine Immobilisierung von 73 nmol His₆-getaggtm (BchY/BchZ)₂ auf eine 1 mL Ni²⁺-beladene Chelating Sepharose FF (GE Healthcare) Säule. Das immobilisierte (BchY/BchZ)₂-Protein wurde mit 2 mL Prä-Elutionspuffer 2 (2.5.3.1) gewaschen. Das Säulenmaterial wurde in 365 µM Chlide und 1 mL Prä-Elutionspuffer 2 für 10 min inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 2 mL Prä-Elutionspuffer 3 (2.5.3.1) und 0.5 mL Elutionspuffer wurde der mit Chlide gesättigte (BchY/BchZ)₂-Komplex mit 1.5 mL Elutionspuffer (2.5.3.1) eluiert. Die Menge an gebundenem Chlide wurde mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Zur Kontrolle von unspezifisch gebundenen Chlide wurde parallel eine Reinigung ohne Zugabe von (BchY/BchZ)₂ durchgeführt.

Die Ko-Reinigung wurde bei 17 °C, in Dunkelheit und unter anaeroben Bedingungen (95 % N₂, 5 % H₂, <1 ppm O₂) in einer Anaerobenkammer (Type B flexible vinyl chamber, Coy Laboratories) durchgeführt.

2.9 Interaktionsstudien

Um die Interaktion der (BchX)₂- und (BchY/BchZ)₂-Untereinheiten der COR nachzuweisen, wurde zusätzlich das ATP-Analogon MgADP·AlF₄⁻ zugegeben. Das MgADP·AlF₄⁻ kann den Übergangszustand der ATP-Hydrolyse nachahmen (Moser *et al.*, 2013; Schindelin *et al.*, 1997).

2.9.1 Bildung des ternären COR-Komplexes auf einer S-Agarose-Säule

Eine Poly-Prep® -Säule (Bio-Rad) mit 100 µL S-Agarose (Merck Millipore) wurde mit 1 mL Puffer B äquilibriert. Nachdem das überproduzierte Trx/His₆/S-getaggte (BchX)₂ (zellfreier Extrakt) zugegeben wurde, erfolgten zwei Waschschrritte mit 700 µL und 200 µL Puffer B.

Die Bildung von MgADP·AlF₄⁻ erfolgte durch Zugabe von 2 mM AlCl₃ und 10 mM MgADP zu Puffer B mit 50 mM NaF in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen (30 mL

Komplexpuffer). Nach einer Inkubation von 30 min bei 17 °C wurden zu 1 mL Komplexpuffer 6.3 nmol gereinigtes (BchY/BchZ)₂ und 127 µM Chlide zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 1 h in Dunkelheit mit 2.5 nmol immobilisiertem (BchX)₂ auf der Säule inkubiert. Alle 15 min wurde das Säulenmaterial gemischt. Die Säulenmatrix wurde mit 500 µL Komplexpuffer gewaschen. Um die immobilisierten Proteine von der S-Agarose zu lösen, wurde das Säulenmaterial 1:1 mit 2-fach SDS-Probenpuffer (2.6.2) gemischt und für 10 min bei 95 °C (Thermomixer compact, Eppendorf) inkubiert. Die Bildung des ternären Komplexes wurde mit Hilfe der SDS-PAGE (2.6.2) überprüft.

Zur Kontrolle wurde die Reinigung in Abwesenheit von (BchX)₂ oder (BchY/BchZ)₂ durchgeführt. Sämtliche Experimente zur ternären Komplexbildung erfolgten bei 17 °C im Dunkeln und unter anaeroben Bedingungen.

2.9.2 Bildung des ternären COR-Komplexes auf einer Protino® Glutathion-Agarose-Säule

Eine Poly-Prep® -Säule (Bio-Rad) mit 1 mL Protino® Glutathion Agarose 4B (Macherey-Nagel) wurde mit 20 mL Puffer B äquilibriert. Nachdem das überproduzierte GST-getaggte (BchX)₂ (zellfreier Extrakt) zugegeben wurde, erfolgte ein Waschschriff mit 10 mL Puffer B.

Die Bildung von MgADP·AlF₄⁻ erfolgte wie oben beschrieben. Nach der Inkubation wurden zu 1.4 mL Komplexpuffer 13.8 nmol gereinigtes (BchY/BchZ)₂ und 27.7 µM Chlide zugegeben. 5.5 nmol immobilisiertes (BchX)₂ wurde mit diesem Ansatz für 1 h und 20 min in Dunkelheit inkubiert. Nach 1 h wurde das Säulenmaterial gemischt. Danach erfolgten zwei Waschschriffe mit 4 mL und 3 mL Komplexpuffer. Anschließend wurde der ternäre Komplex an der PreScission™-Schnittstelle der (BchX)₂-Untereinheit proteolytisch (10 U PreScission™-Protease pro mg BchX in Komplexpuffer; GE Healthcare) von der Säule gespalten. Der proteolytische Verdau erfolgte für 4 h bei 4 °C auf einem Rollinkubator (RM 5, Assistent) in einer Anaerobenflasche. Die Proteine wurden mit 1.5 mL, und zweimal 1 mL Komplexpuffer eluiert. Nach Vereinigung der Elutionsfraktionen wurde die Probe konzentriert (2.5.5) und die Interaktion der COR-Untereinheiten wurde mit Hilfe der SDS-PAGE (2.6.2) verifiziert.

Zur Kontrolle wurde die Reinigung in Abwesenheit von (BchX)₂ oder (BchY/BchZ)₂ durchgeführt. Die ternäre Komplexbildung erfolgte bei 17 °C, in Dunkelheit und unter anaeroben Bedingungen.

Komplexpuffer	Puffer B	
	NaF	50 mM
	AlCl ₃	2 mM
	MgADP	10 mM

3 Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Enzymkomplex der COR aus *R. denitrificans* untersucht. Es erfolgte die *in vitro* Charakterisierung der COR-Untereinheiten BchX, BchY und BchZ. Dabei wurde die Interaktion der (BchX)₂-Untereinheit mit dem katalytischen (BchY/BchZ)₂-Komplex nachgewiesen. Außerdem erfolgte die Charakterisierung der an der Reduktion beteiligten [Fe-S]-Cluster der COR-Subkomplexe.

3.1 Charakterisierung der COR-Untereinheiten BchX, BchY und BchZ

Die drei COR-Proteine BchX, BchY und BchZ werden im folgenden Kapitel näher beschrieben. Für die Experimente wurden die Proteine separat rekombinant produziert und *in vitro* analysiert.

3.1.1 Klonierung, rekombinante Produktion und Reinigung von (BchY/BchZ)₂

Im (BchY/BchZ)₂-Komplex der COR besitzt die BchZ-Untereinheit eine sehr hohe Affinität zu BchY, sodass eine Ko-Reinigung beider Proteine möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Vektor pACYC-*bchYZ* (Tabelle 5) (Dannheim, 2011) das Fusionsprotein His₆-BchY und die BchZ-Untereinheit der COR in *E. coli* BL21 (λ DE3)-Zellen unter aeroben Bedingungen überproduziert (2.5.1). Es wurde vermutet, dass die Zugabe von Eisen(III)citrat und L-Cysteinhydrochlorid während der Kultivierung zu einer verbesserten [Fe-S]-Cluster-Biosynthese in (BchY/BchZ)₂ führt. Nach der Zellernte (2.5.1) wurden alle nachfolgenden Experimente am (BchY/BchZ)₂-Komplex unter anaeroben Bedingungen in einer Anaerobenkammer durchgeführt.

Mit Hilfe des N-terminalen His₆-Tags wurde BchY über eine Ni²⁺-IDA-Säule gereinigt. Die Reinigung wurde, wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben, durchgeführt. Die Analyse der rekombinanten Produktion und der anschließenden Affinitätsreinigung erfolgte mittels SDS-PAGE (Abbildung 10).

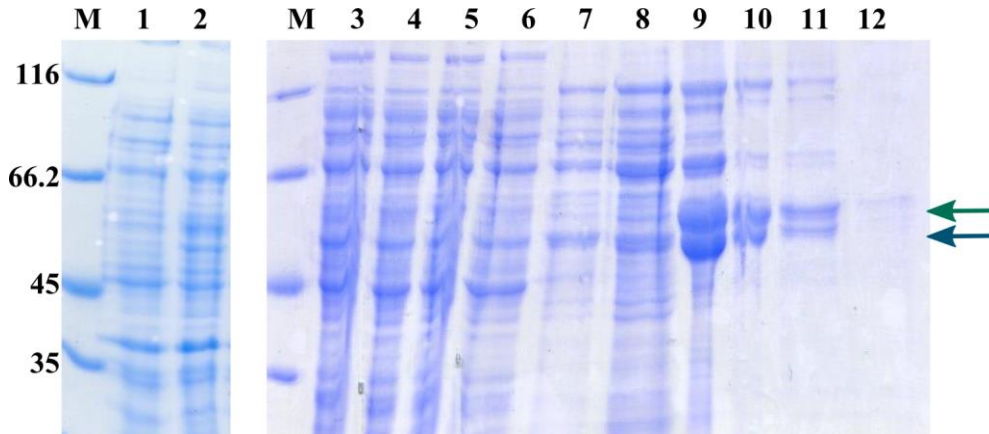


Abbildung 10: Rekombinante Produktion und Ko-Reinigung von (BchY/BchZ)₂.

Die Überproduktion von (BchY/BchZ)₂ (pACYC-*bchYZ*) in *E. coli* BL21 (λ DE3) erfolgte für 4 h bei 25 °C nach Induktion mit 50 μM IPTG und Zugabe von 1 mM Eisen(III)citrat und 1 mM L-Cysteinhydrochlorid (2.5.1). Die Ko-Reinigung des His₆-getaggten BchY mit BchZ erfolgte über eine mit Ni²⁺ beladene IDA-Sepharose-Säule (1 mL). Nach drei Waschschritten mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen im verwendeten Puffer wurde (BchY/BchZ)₂ bei einer Konzentration von 200 mM Imidazol (2.5.3.1) eluiert. Die Proben der rekombinanten Produktion und die einzelnen Fraktionen der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proben der rekombinanten Produktion wurden OD_{578 nm}-bereinigt aufgetragen, wobei eine OD_{578 nm} von 0.5 einem Auftragsvolumen von 10 μL entsprach. Die Trennung erfolgte mit einem 12 %igen SDS-Gel. Zur Visualisierung wurde Coomassie Brilliant Blue verwendet (2.6.2). Die Pfeile zeigen die Proteinbanden von BchY (56 kDa, inklusive His₆-Tag, grüner Pfeil) und BchZ (53 kDa, blauer Pfeil).

M, 7 μL Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific), Angabe der relativen Molekülmasse x 1000; **Spur 1**, 10 μL Probe vor der Induktion; **Spur 2**, 2.5 μL Probe nach der Induktion; **Spur 3**, 2 μL zellfreier Extrakt nach der Ultrazentrifugation; **Spur 4**, 2 μL Durchlauf 1; **Spur 5**, 2 μL Durchlauf 2, **Spur 6**, 10 μL Waschschr. 1; **Spur 7**, 10 μL Prä-Elution 1; **Spur 8**, 10 μL Prä-Elution 2; **Spur 9**, 2 μL Elution 1; **Spur 10**, 2 μL Elution 2; **Spur 11**, 10 μL Elution 3 und **Spur 12**, 10 μL Elution 4.

Die in Abbildung 10 gezeigte rekombinante Produktion führte zur Bildung des His₆-getaggten BchY und BchZ (Vergleich Abbildung 10, *Spur 1* und 2). Der zellfreie Extrakt wurde zweimal auf die Ni²⁺-IDA-Säule gegeben (*Spur 3* bis 5). Die Abtrennung von verunreinigenden Proteinen erfolgte durch verschiedene Waschschr. mit geringer Imidazol-Konzentration (*Spur 6* bis 8). Das Fusionsprotein wurde bei einer Imidazol-Konzentration von 200 mM Imidazol eluiert (*Spuren 9* bis 12).

Mittels SDS-PAGE wurde ein Protein bei einer relativen Molekülmasse von $M_r = 56'000$ detektiert. Dies entspricht der berechneten Molekülmasse für das His₆-getaggte BchY (56'370 Da; Abbildung 10, *Spur 9 bis 11*, grüner Pfeil). Diese Art der Reinigung zeigte zudem ein zweites Protein mit einer relativen Molekülmasse von $M_r = 53'000$ (Abbildung 10, *Spur 9 bis 11*, blauer Pfeil). Dieses ko-gereinigte Protein wurde durch Identifizierung der N-terminalen Aminosäuren mittels Edman-Abbau (2.6.4) als BchZ-Untereinheit der COR identifiziert (Dannheim, 2011). Offensichtlich ermöglichen die beiden T7-Promotoren des verwendeten pACYC-*bchYZ* Vektors eine stöchiometrische Überproduktion und eine anschließende Ko-Reinigung der COR-Untereinheiten BchY und BchZ (Novagen, 2011; Tolia & Joshua-Tor, 2006). Diese starke Interaktion wurde erstmals für BchY und BchZ aus *R. capsulatus* von Nomata *et al.* (2006b) beobachtet. Effiziente Ko-Reinigungen wurden auch für die homologen DPOR- und Nitrogenase-Untereinheiten BchN und BchB sowie NifD und NifK durchgeführt (Christiansen *et al.*, 1998; Fujita & Bauer, 2000; Swisher *et al.*, 1977).

Die weitere Charakterisierung des (BchY/BchZ)₂-Komplexes, insbesondere die spektroskopische Untersuchung des [Fe-S]-Clusters erforderte eine Optimierung des Reinigungsprotokolls (2.5.3.1, Abbildung 11). Die Reinigung wurde, wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben, durchgeführt. Dem zellfreien Extrakt wurde eine geringe Imidazol-Konzentration (20 mM) zugegeben. Außerdem wurde das Säulenmaterial mit 20 mM Imidazol im Puffer äquilibriert. Unter diesen Bedingungen konnten unspezifische *E. coli* Proteine nicht mehr an die Säule binden (GE Healthcare Bio-Science AB, 2009).

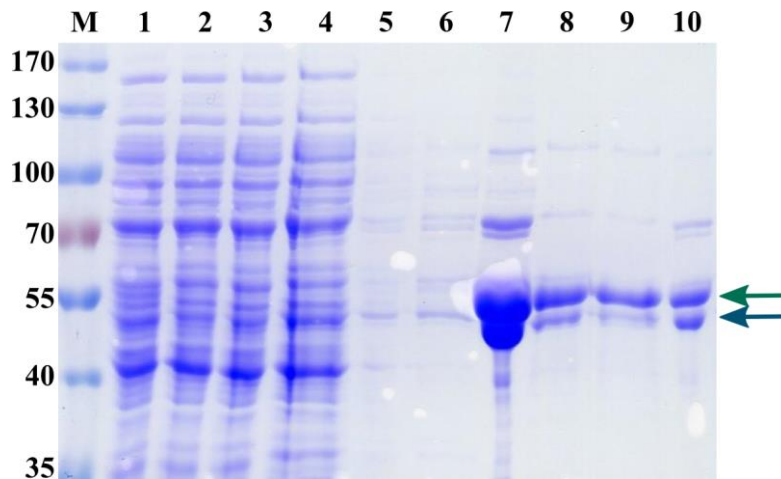


Abbildung 11: Ko-Reinigung von (BchY/BchZ)₂ in Anwesenheit von 20 mM Imidazol.

Die Affinitätschromatographie des His₆-getaggtten BchY mit BchZ erfolgte über eine mit Ni²⁺ beladene IDA-Sephrose-Säule (1 mL). Das Säulenmaterial wurde mit 20 mM Imidazol im Puffer äquilibriert (2.5.3.1). Der zellfreie Extrakt wurde auf eine Endkonzentration von 20 mM Imidazol im Puffer eingestellt. Nach drei Waschschritten mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen im verwendeten Puffer wurde (BchY/BchZ)₂ bei einer Konzentration von 200 mM Imidazol eluiert (2.5.3.1). Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE. Zur Visualisierung wurde das 12 %ige SDS-Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (2.6.2). Die Pfeile zeigen die Proteinbanden von BchY (56 kDa, inklusive His₆-Tag, grüner Pfeil) und BchZ (53 kDa, blauer Pfeil).

M, 7 µL PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), Angabe der relativen Molekülmasse x 1000; **Spur 1**, 2 µL zellfreier Extrakt nach der Ultrazentrifugation; **Spur 2**, 2 µL Durchlauf 1; **Spur 3**, 2 µL Durchlauf 2, **Spur 4**, 10 µL Waschschr. 1; **Spur 5**, 10 µL Prä-Elution 1; **Spur 6**, 10 µL Prä-Elution 2; **Spur 7**, 2 µL Elution 1; **Spur 8**, 10 µL Elution 2; **Spur 9**, 10 µL Elution 3 und **Spur 10**, 2 µL Elution 1 1:5 verdünnt.

Abbildung 11 zeigt die SDS-PAGE der optimierten Affinitätsreinigung des His₆-getaggtten BchY über eine Ni²⁺-IDA-Säule. Der zellfreie Extrakt wurde zweimal auf die Ni²⁺-IDA-Säule gegeben (Abbildung 11, *Spur 1* bis *3*). Die Abtrennung von verunreinigenden Proteinen erfolgte durch drei Waschschr. mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen (*Spuren 4* bis *6*). Das Fusionsprotein wurde bei einer Imidazol-Konzentration von 200 mM Imidazol eluiert (*Spuren 7* bis *10*). Insgesamt wurden etwa 14 mg Protein aus 2 L *E. coli* Kultur gereinigt. Durch die Anwesenheit von 20 mM Imidazol wurden insgesamt weniger *E. coli* Proteine an die Säulenmatrix (*Spuren 4-6*) gebunden. Demnach wurde das His₆-getaggte BchY (M_r = 56'000) und die BchZ-Untereinheit (M_r = 53'000) mit weniger verunreinigenden Proteinen gereinigt (Vergleich Abbildung 10 *Spur 9* mit Abbildung 11 *Spur 7*, grüner und blauer Pfeil).

3.1.2 Klonierung, rekombinante Produktion und Reinigung von (BchX)₂

Das Trx/His₆/S-getaggte BchX wurde mittels des Vektors pET-*bchX* (Tabelle 5) unter aeroben Bedingungen in *E. coli* BL21 (λ DE3)-Zellen überproduziert (2.5.1). Bei der rekombinanten Produktion von (BchX)₂ wurde ebenfalls vermutet, dass die Zugabe von Eisen(III)citrat und L-Cysteinhydrochlorid während der Kultivierung zu einer verbesserten [Fe-S]-Cluster-Bildung führt. Zusätzlich enthielt der verwendete *E. coli*-Stamm den Vektor pRKISC. Dieser trägt alle Gene des *isc*-Operons, die für den [Fe-S]-Cluster-Aufbau in *E. coli* notwendig sind. Es wurde vermutet, dass dadurch eine effiziente [Fe-S]-Cluster-Biogenese während der BchX-Überproduktion sicher gestellt werden kann (Takahashi & Nakamura, 1999). Nach der Zellernte (2.5.1) wurden alle Experimente unter anaeroben Bedingungen in einer Anaerobenkammer durchgeführt.

Die Affinitätschromatographie mittels des N-terminalen His₆-Tags von BchX erfolgte über eine Ni²⁺-IDA-Säule (2.5.3.1). Die Reinigung wurde, wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben, durchgeführt. Die Analyse der Reinigung erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE, welche in Abbildung 12 dargestellt ist.

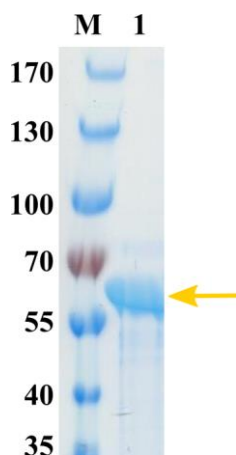


Abbildung 12: Reinigung von (BchX)₂ mittels Trx/His₆/S-Tag.

Die Affinitätschromatographie des Trx/His₆/S-getaggten BchX erfolgte über eine mit Ni²⁺ beladene IDA-Sephrose-Säule (7 mL). Das Säulenmaterial wurde mit 20 mM Imidazol im Puffer äquilibriert (2.5.3.1). Der zellfreie Extrakt wurde auf eine Endkonzentration von 20 mM Imidazol eingestellt. Nach drei Waschschritten mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen im verwendeten Puffer wurde (BchX)₂ bei einer Konzentration von 200 mM Imidazol (2.5.3.1) eluiert. Die Analyse der Elutionsfraktion erfolgte mittels SDS-PAGE. Zur Visualisierung wurde das 12 %ige SDS-Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (2.6.2). Der gelbe Pfeil zeigt die Proteinbande von BchX (53 kDa, inklusive Trx/His₆/S-Tag).

M, 7 µL PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), Angabe der relativen Molekülmasse x 1000; **Spur 1**, 5 µL vereinigte Elutionen 1-3.

Der zellfreie Extrakt wurde insgesamt zweimal auf die Ni²⁺-IDA-Säule gegeben. Nach mehreren Waschschritten mit geringeren Imidazolkonzentrationen wurde BchX mit 200 mM Imidazol im Puffer von der Säulenmatrix eluiert. Insgesamt wurde etwa 96 mg (BchX)₂ aus 1.5 L *E. coli* Kultur gereinigt (Abbildung 12, *Spur 1*). Mit Hilfe der SDS-PAGE wurde ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von $M_r = 53'000$ detektiert. Dies entspricht der berechneten Molekülmasse für das Trx/His₆/S-getaggte BchX (53'370 Da, Abbildung 12, *Spur 2*, gelber Pfeil).

In dieser Arbeit wurde der Vektor pGEX-*bchX* (Tabelle 5), wie in Kapitel 2.4 beschrieben, konstruiert. Der pGEX-*bchX*-Vektor kodiert für das Fusionsprotein BchX mit N-terminalen GST-Tag (Anhang 1). Die Überproduktion des Fusionsproteins GST-BchX erfolgte in *E. coli* BL21 (λ DE3)-Zellen unter aeroben Bedingungen (2.5.1). Auch bei dieser Produktion wurde Eisen(III)citrat und L-Cysteinhydrochlorid während der Kultivierung zur verbesserten [Fe-S]-Cluster-Bildung zugegeben und nach der Zellernte (2.5.1) wurden alle Experimente unter Sauerstoff-Ausschluss durchgeführt.

Mit Hilfe des N-terminalen GST-Tags wurde BchX über eine Glutathion-Agarose-Säule gereinigt. Die Reinigung wurde, wie in Kapitel 2.5.3.2 beschrieben, durchgeführt. Die Analyse der einzelnen Schritte der rekombinanten Produktion (Abbildung 13, *Spur 1* und *2*) und der Reinigung erfolgte mittels SDS-PAGE (Abbildung 13, *Spuren 3* bis *9*).

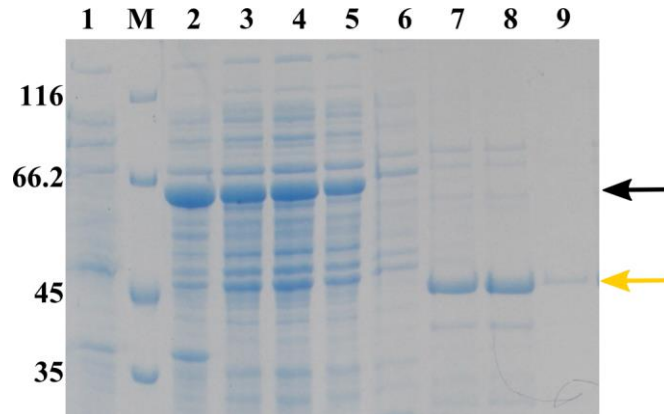


Abbildung 13: Reinigung von (BchX)₂ mittels GST-Tag.

Die Überproduktion von (BchX)₂ (pGEX-*bchX*) in *E. coli* BL21 (λ DE3)-Zellen erfolgte für 4 h bei 25 °C nach Induktion mit 50 μM IPTG und Zugabe von 1 mM Eisen(III)citrat und 1 mM L-Cysteinhydrochlorid (2.5.1). Die Reinigung des GST-getaggten BchX erfolgte über eine Glutathion-Agarose-Säule (1 mL). Nach einem Waschschrift wurde der GST-Tag über Nacht bei 4 °C mit 200 U/mg PreScissionTM Protease entfernt (2.5.3.2). Die Proben der rekombinanten Produktion und die einzelnen Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proben der rekombinanten Produktion wurden OD_{578 nm}-bereinigt aufgetragen, wobei eine OD_{578 nm} von 0.5 einem Auftragsvolumen von 10 μL entsprach. Die Analyse erfolgte mit einem 12 %igen SDS-Gel. Zur Visualisierung wurde Instant BlueTM (Expedeon) verwendet (2.6.2). Die Pfeile zeigen die Proteinbanden des GST-getaggten BchX (63 kDa, inklusive GST-Tag, schwarzer Pfeil) und BchX (37 kDa, gelber Pfeil).

Spur 1, 10 μL Probe vor der Induktion; **M**, 7 μL Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific), Angabe der relativen Molekülmasse x 1000; **Spur 2**, 2.3 μL Probe nach der Induktion; **Spur 3**, 2 μL zellfreier Extrakt nach der Ultrazentrifugation; **Spur 4**, 2 μL Durchlauf 1; **Spur 5**, 2 μL Durchlauf 2, **Spur 6**, 10 μL Waschschrift; **Spur 7**, 10 μL Elution 1; **Spur 8**, 10 μL Elution 2; **Spur 9**, 10 μL Elution 3.

Die in Abbildung 13 gezeigte rekombinante Produktion führte zur Bildung des GST-getaggten (BchX)₂ (*Spur 1* und *2*). Der zellfreie Extrakt wurde zweimal auf die Glutathion-Agarose-Säule gegeben (Abbildung 13, *Spur 3* bis *5*). Die Abtrennung von verunreinigenden Proteinen erfolgte durch einen Waschschrift (*Spur 6*). Nach dem proteolytischen Verdau des GST-Tags mit der PreScissionTM Protease wurde (BchX)₂ in drei Fraktionen (*Spuren 7* bis *9*) eluiert. Insgesamt wurde circa 2 mg (BchX)₂ aus 2 L *E. coli* Kultur gereinigt. Mittels der SDS-PAGE wurde ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von $M_r = 37'000$ detektiert. Dies entspricht der berechneten Molekülmasse für BchX (36'600 Da, Abbildung 13; *Spuren 7* bis *9*). Mit dieser

erfolgreichen Reinigung des GST-getaggtten BchX wurde die Grundlage für weiterführende Interaktionsstudien zum Nachweis des postulierten ternären Komplexes der COR gelegt.

Für alle nachfolgenden Experimente in dieser Arbeit wurden die in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.2 gereinigten (BchX)₂- und (BchY/BchZ)₂-Untereinheiten der COR verwendet.

3.1.3 Analytische Gelpermeationschromatographie von (BchY/BchZ)₂

Für mögliche Kristallisationsexperimente wurde der (BchY/BchZ)₂-Komplex aus *R. denitrificans* mittels analytischer Gelpermeationschromatographie (GPC) untersucht (Abbildung 14).

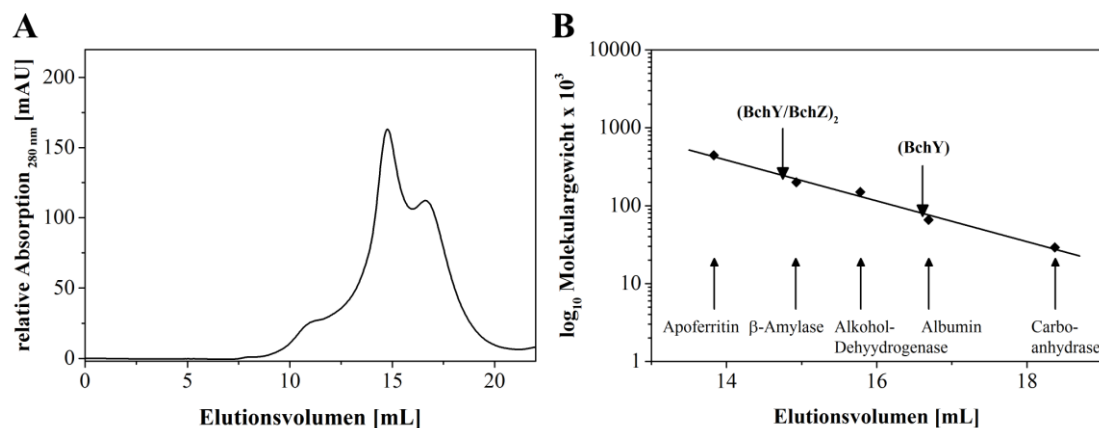


Abbildung 14: Analytische GPC von (BchY/BchZ)₂.

A, Die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades der (BchY/BchZ)₂-Untereinheit (44 µM) erfolgte über eine Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) Gelfiltrationssäule. Die GPC erfolgte mit einem FPLC-System (ÄKTA purifier, GE Healthcare) und wurde mit der UNICORN Control Software überwacht. Die Chromatographie fand unter anaeroben Bedingungen mit einer Flussrate von 0.5 mL/min statt. Die Proteine wurden bei einer Absorption von 280 nm detektiert. **B**, Kalibrierungsgerade der Superdex 200 HR 10/30. Als Protein-Standards wurden Apoferritin (443 kDa), β-Amylase (200 kDa), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa), Albumin (66 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa) verwendet (Gel Filtration Molecular Weight Markers Kit for Molecular Weights 12-200 kDa“ und „Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 29-700 kDa von Sigma Aldrich). Die schwarzen Pfeile zeigen das Elutionsvolumen der eingesetzten Protein-Standards und die ermittelten nativen Molekülmassen von (BchY/BchZ)₂ und (BchY).

Der gereinigte (BchY/BchZ)₂-Komplex wurde mit Hilfe einer Superdex 200 HR 10/30 Gelfiltrationssäule untersucht (Abbildung 14 A). Zuvor wurde die Gelfiltrationssäule mit verschiedenen Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht kalibriert. Mit Hilfe der

erstellten Kalibriergeraden und dem Elutionsvolumen wurde das native Molekulargewicht bestimmt (Abbildung 14 B).

Im Elutionsprofil von (BchY/BchZ)₂ lassen sich drei unterschiedliche Peaks erkennen (Abbildung 14 A). Der erste Peak wurde nach 10.9 mL detektiert. Mit Hilfe der Kalibrierung wurde eine Molekülmasse >2000 kDa ermittelt. Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um aggregierte Proteine handelt. Der zweite Peak bei 14.8 mL zeigte die höchste Absorption. Anhand der Kalibrierungsgeraden entsprach dies einer nativen Molekülmasse von 239'000 Da. Dabei handelt es sich vermutlich um den heterotetrameren (BchY/BchZ)₂-Komplex (berechnete Molekülmassen für His₆-BchY und BchZ sind 56'370 Da und 53'380 Da). Für den dritten Absorptionspeak bei 16.6 mL wurde eine native Molekülmasse von 80 kDa ermittelt. Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um His₆-BchY (56'370 Da) handeln könnte.

Anhand der ermittelten nativen Molekülmasse von 80 kDa könnte BchY sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegen. Ähnliche Ergebnisse zeigten analytische GPC-Experimente für (ChlN/ChlB)₂ aus *P. marinus*. Neben (ChlN/ChlB)₂ wurde auch ChlN detektiert (Bröcker *et al.*, 2008b). Das (BchY/BchZ)₂-Heterotetramer zeigt demnach den gleichen strukturellen Aufbau wie die homologen Komplexe (BchN/BchB)₂/(ChlN/ChlB)₂ und (NifD/NifK)₂ der DPOR und Nitrogenase (Kim & Rees, 1992; Nomata *et al.*, 2006b; Nomata *et al.*, 2005; Wätzlich, 2009; Wätzlich *et al.*, 2009).

3.2 *In vitro* COR-Aktivität

Die Aktivität des COR-Enzyms wurde mit einem *in vitro* gekoppelten DPOR/COR-Aktivitätstest gemessen. Der von Bröcker *et al.* (2008a) entwickelte *in vitro* DPOR-Aktivitätstest diente Wätzlich (2009) als Grundlage für einen gekoppelten DPOR/COR-Aktivitätstest (2.7.2).

Das *in vitro* DPOR-System aus *C. tepidum* (Bröcker *et al.*, 2008a) im gekoppelten DPOR/COR-Aktivitätstest wandelt das Pchlide-Molekül (2.7.1) in das COR-Substrat Chlide um. Für die Bestimmung der Aktivität des COR-Enzyms wurden zu gereinigtem

(BchY/BchZ)₂ (2.5.3.1) und überproduziertem (BchX)₂ (als zellfreier Extrakt, 2.5.2) Pchlde, DTT und NDT (als artifizieller Elektronendonator) und ATP in Kombination mit einem ATP regenerierenden System hinzugefügt. Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie untersucht (Abbildung 15).

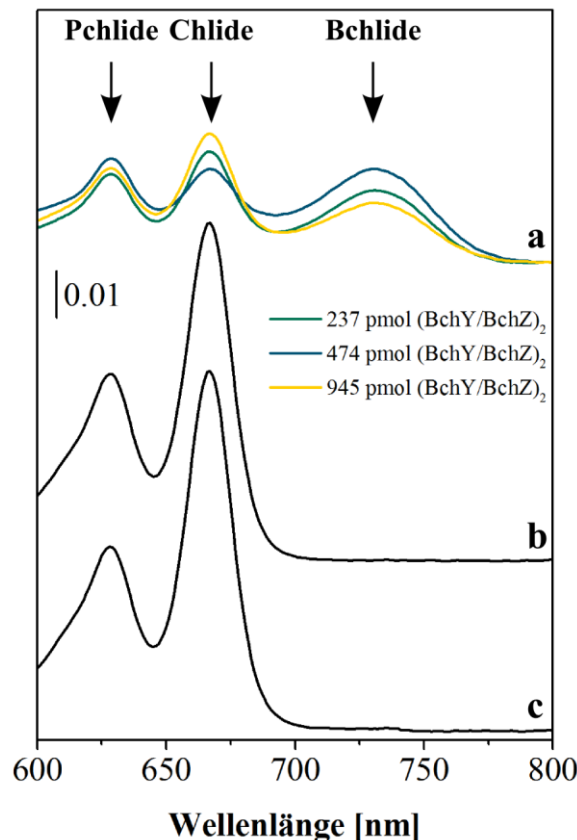


Abbildung 15 *In vitro* gekoppelter DPOR/COR-Aktivitätstest.

UV/Vis-Spektren eines gekoppelten DPOR/COR-Aktivitätstests nach Extraktion der Pigmente mit Aceton. Absorptionsmaxima der Substrate Pchlde (628 nm), Chlide (667 nm) und Bchlde (734 nm) sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. **Spektrum a**, gekoppelter Standard DPOR/COR-Aktivitätstest mit 237 pmol (grünes Spektrum), 474 pmol (blaues Spektrum) oder 945 pmol (gelbes Spektrum) (BchY/BchZ)₂ und 5 µL zellfreiem Extrakt mit (BchX)₂; **Spektren b und c**, Negativkontrolle in Abwesenheit der COR-Untereinheiten (BchY/BchZ)₂ (b) beziehungsweise (BchX)₂ (c).

In Abbildung 15 sind die UV/Vis-Spektren der mit Aceton extrahierten Pigmente dargestellt. Die Aktivität der DPOR und COR ist durch die effiziente Umwandlung von Pchlde (626 nm, Fujita & Bauer, 2000) in Chlide (665 nm, McFeeters *et al.*, 1971) und schließlich in Bchlde (734 nm, Nomata *et al.*, 2006b) zu beobachten (Abbildung 15, *Spektrum a*). Außerdem ist zu erkennen, dass bei einer konstanten Menge an (BchX)₂ und einer Erhöhung von 237 pmol (BchY/BchZ)₂ auf 474 pmol die Bchlde-Produktbildung

zunimmt (Abbildung 15, *Spektrum a; grünes und blaues Spektrum*). Dagegen nimmt die Bildung von Bchl_a ab, wenn die (BchY/BchZ)₂-Menge auf 945 pmol erhöht wird (Abbildung 15, *Spektrum a; gelbes Spektrum*). Hierbei wird deutlich, dass die Aktivität der COR vermutlich vom Verhältnis der aktiven Untereinheiten abhängig ist.

Es konnte auch gezeigt werden, dass ohne Zugabe von (BchY/BchZ)₂ oder (BchX)₂ keine Bildung von Bchl_a stattfindet (Abbildung 15, *Spektrum b und c*). Das Experiment ohne (BchX)₂ deutet darauf hin, dass die Elektronen übertragende Untereinheit (BchL)₂ der DPOR nicht die COR-spezifische Reduktase (BchX)₂ im verwendeten gekoppelten Aktivitätstest substituieren kann. In einer früheren Studie wurden mit Hilfe eines DPOR-Aktivitätstests verschiedene chimäre Enzyme analysiert. Es wurde gezeigt, dass ein chimäres Enzym, bestehend aus (BchN/BchB)₂/(ChlN/ChlB)₂ und (NifH)₂ aus *A. vinelandii*, keine DPOR-Aktivität besitzt. Dagegen zeigte ein chimäres Enzym, bestehend aus (BchX)₂ aus *R. denitrificans* und (BchN/BchB)₂ aus *C. tepidum*, DPOR-Aktivität (Wätzlich *et al.*, 2009).

3.3 (BchX)₂ enthält einen [4Fe-4S]-Cluster

Mit Hilfe der UV/Vis- und der EPR-Spektroskopie sollte der [Fe-S]-Cluster der (BchX)₂-Untereinheit aus *R. denitrificans* charakterisiert werden.

3.3.1 UV/Vis-Spektroskopie und Rekonstitution von (BchX)₂

In einer früheren Studie wurde bereits ein Eisen-Gehalt von 3.4 mol Eisen pro mol (BchX)₂ bestimmt (Wätzlich *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde (BchX)₂, wie in Kapitel 2.5.3.1 und 2.5.5 beschrieben, gereinigt und konzentriert. Anschließend wurde das (BchX)₂-Protein mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie analysiert (Abbildung 16 A und B).

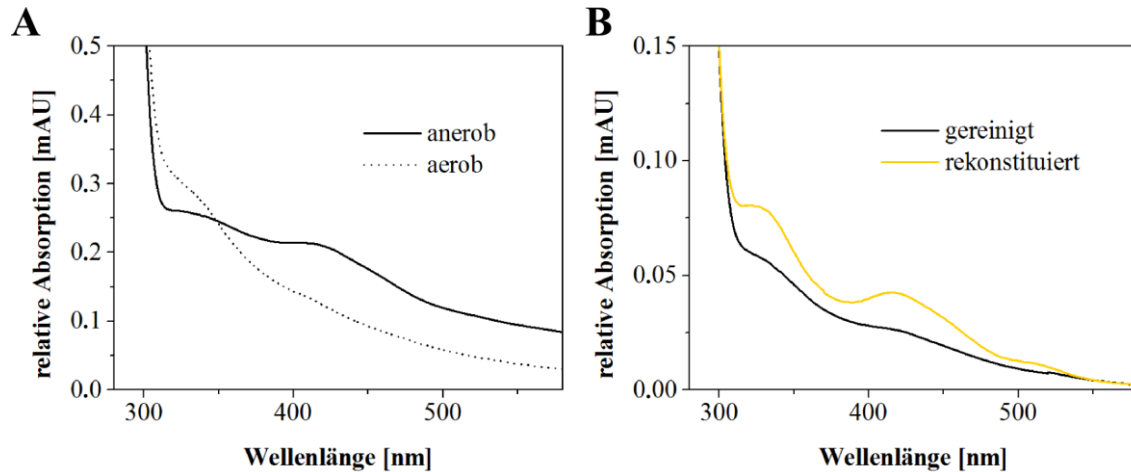


Abbildung 16: UV/Vis-Spektroskopie und *in vitro* [Fe-S]-Cluster-Rekonstitution von (BchX)₂

A, UV/Vis-Absorptionsanalyse von (BchX)₂ unter anaeroben Bedingungen (durchgezogene Linie) und nach aerober Inkubation der Probe über Nacht bei 4 °C (gestrichelte Linie); **B**, UV/Vis Spektrum von (BchX)₂ vor (schwarze Linie) und nach (gelbe Linie) der *in vitro* Rekonstitution des [Fe-S]-Clusters.

Für (BchX)₂ ist im UV/Vis-Spektrum lediglich ein leichtes Absorptionsmaximum bei 410 nm zu erkennen (Abbildung 16 A, *durchgezogene Linie*). Gleichzeitig wurde eine leichte Braunfärbung der Probe beobachtet. Ein Absorptionsmaximum bei 410 nm ist charakteristisch für einen [4Fe-4S]-Cluster (Duin *et al.*, 1997). Die aerobe Inkubation resultierte in einem Verlust des Maximums bei 410 nm (Abbildung 16 A, *gestrichelte Linie*). Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Sauerstoff-Exposition der [4Fe-4S]-Cluster von (ChlL)₂ aus *P. marinus* und (NifH)₂ aus verschiedenen Nitrogenasen beobachtet (Bröcker *et al.*, 2008b; Wiig *et al.*, 2011)

Für das gereinigte (BchX)₂-Protein wurde lediglich eine Schulter bei einer Wellenlänge von etwa 410 nm beobachtet (Abbildung 16 B, *schwarze Linie*). Aus diesem Grund wurde der [Fe-S]-Cluster der (BchX)₂-Untereinheit *in vitro* rekonstituiert. Dabei ergab sich ein sehr deutliches Absorptionsmaximum bei 410 nm (Abbildung 16 B; *gelbe Linie*). Gleichzeitig wurde auch eine deutliche Braunfärbung der Proteinprobe beobachtet. Diese Ergebnisse unterstützten die Vermutung, dass (BchX)₂ einen [4Fe-4S]-Cluster besitzt.

3.3.2 EPR-Analyse von (BchX)₂

Der vorgeschlagene [4Fe-4S]-Cluster des (BchX)₂ aus *R. denitrificans* sollte mittels EPR-Messungen einer rekonstituierten Proteinprobe nachgewiesen werden (Abbildung 17; 2.6.7).

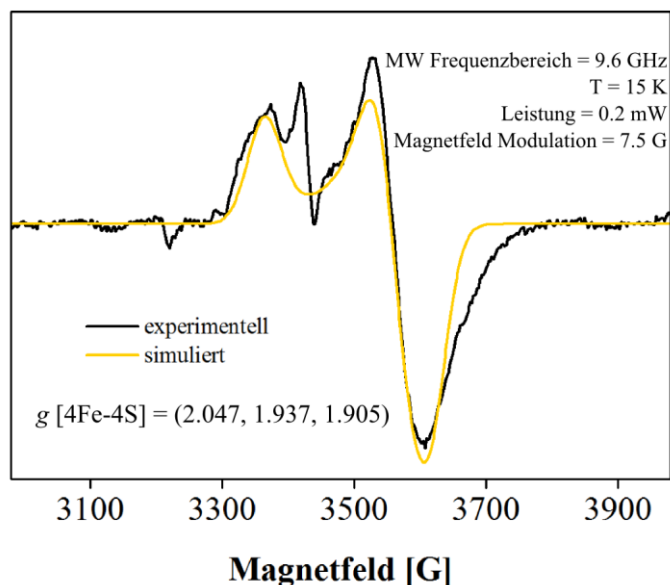


Abbildung 17: EPR-Spektroskopie von (BchX)₂.

EPR-Spektrum von (BchX)₂ nach Reduktion mit 12.5 mM NDT (schwarze Linie). Simulation der experimentellen Werte (gelbe Linie). Der verwendete Mikrowellen (MW) Frequenzbereich, die Temperatur, die Leistung und Modulation des Magnetfeldes sind angegeben. Die *g*-Werte wurden anhand der experimentellen Daten berechnet. Das Spektrum des rekonstituierten (BchX)₂ ist charakteristisch für einen [4Fe-4S]-Cluster.

Die Messungen wurden von Dr. Edward Reijerse, Leiter der Arbeitsgruppe „Bio Hydrogen“ am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion, durchgeführt.

Nach der Reduktion mit NDT ergab sich ein typisches EPR-Spektrum für einen [4Fe-4S]¹⁺-Cluster mit einem rhombischen *S* = 1/2 EPR-Signal (*schwarzes Spektrum*). Aus den experimentellen Daten wurde ein Spektrum simuliert (*gelbes Spektrum*). Das EPR-Signal zeigte *g*-Werte im Bereich von *g*₁ = 2.047, *g*₂ = 1.937 und *g*₃ = 1.905. Diese *g*-Werte sind charakteristisch für [4Fe-4S]¹⁺-Cluster (Guigliarelli & Bertrand, 1999; Mouesca & Lamotte, 1998). Die ermittelten *g*-Werte stimmen gut mit den ermittelten Werten für das (BchL)₂/(ChlL)₂ der DPOR und (NifH)₂ aus *A. vinelandii* überein

(Bröcker *et al.*, 2008b; Lindahl *et al.*, 1985; Nomata *et al.*, 2006a). Auch die experimentellen g -Werte für (BchX)₂ aus *R. sphaeroides* ($g_1 = 2.02$, $g_2 = 1.93$ und $g_3 = 1.92$) liegen im selben Bereich (Kim *et al.*, 2008). Demnach besitzt die (BchX)₂-Untereinheit einen [4Fe-4S]-Cluster.

Sämtliche Messungen gaben keine Hinweise für Spin-Zustände größer als $S = 1/2$ (z. B. $S = 3/2$ oder $S = 5/2$), wie sie für (NifH)₂ aus *A. vinelandii* postuliert wurden (Lindahl *et al.*, 1985). Jedoch lag die Besetzung der Spin-Zustände bei ungefähr 10 %. Somit konnte eine Beteiligung von höheren Spin-Zuständen (mit verbreiterten EPR-Signalen unterhalb der Nachweisgrenze) nicht komplett ausgeschlossen werden. Das zusätzliche Signal bei $g = 2.002$ (Abbildung 17) wurde möglicherweise durch einen geringen Anteil an [3Fe-4S]-Clustern hervorgerufen. Diese könnten bei der Rekonstitution der (BchX)₂-Untereinheit entstanden sein.

Diese biophysikalischen COR-Experimente deuten darauf hin, dass (BchX)₂ aus *R. denitrificans* eine [4Fe-4S]-Cluster-abhängige Redoxkatalyse entsprechend den homologen (ChlL)₂- und (NifH)₂-Proteine katalysiert (Moser *et al.*, 2013; Tezcan *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse stimmen mit einer früheren Studie für das (BchX)₂ aus *R. sphaeroides* überein. Darin wurde ein sehr schwaches EPR-Signal als ein [4Fe-4S]¹⁺-Cluster für das (BchX)₂-Dimer oder alternativ als [2Fe-2S]¹⁺-Cluster für das BchX-Monomer beschrieben (Kim *et al.*, 2008).

3.4 Substratbindung von (BchY/BchZ)₂

In der vorliegenden Arbeit wurde His₆-getaggt (BchY/BchZ)₂ auf einer mit Ni²⁺ beladenen IDA-Sepharose-Säule immobilisiert und mit einem fünffachen molaren Überschuss an Chlide inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde das mit Substrat gesättigte (BchY/BchZ)₂ von der Säule eluiert und mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht (Abbildung 18).

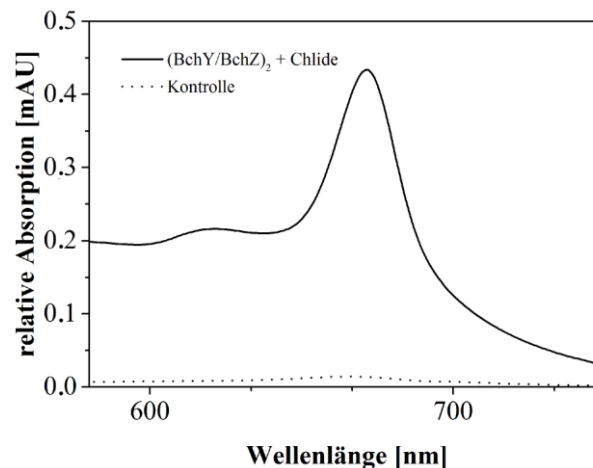


Abbildung 18: Substratbindung von (BchY/BchZ)₂.

(BchY/BchZ)₂ (36 µM) wurde mit Chlide gesättigt und über eine mit Ni²⁺ beladene IDA-Sephrose-Säule gereinigt (2.8.2). Die erste Elutionsfraktion wurde mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie analysiert (schwarzes Spektrum). Der Nachweis von Chlide erfolgte mittels Absorption bei 665 nm. Zur Kontrolle von unspezifisch gebundenen Chlide wurde die Reinigung ohne (BchY/BchZ)₂ durchgeführt (Kontrolle, gestricheltes Spektrum).

Das UV/Vis-Spektrum der Elutionsfraktion zeigt einen Absorptionspeak bei 665 nm (Abbildung 18, *schwarzes Spektrum*). Das Substrat Chlide absorbiert bei einer Wellenlänge von 665 nm (McFeeters *et al.*, 1971). Zur Kontrolle wurde dasselbe Experiment in Abwesenheit von (BchY/BchZ)₂ durchgeführt. Im UV/Vis-Spektrum des Kontrollversuches wurde keine deutliche Absorption bei 665 nm detektiert (*gestricheltes Spektrum*). Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von Chlide und der Proteinkonzentration wurde die Menge an gebundenem Chlide pro (BchY/BchZ)-Protein ermittelt (McFeeters *et al.*, 1971). Anhand dieser Daten wurden etwa 1.4 ± 0.2 Chlide-Moleküle pro (BchY/BchZ)-Protein bestimmt. Basierend auf diesem Ergebnis wurde vermutet, dass der heterotetramere (BchY/BchZ)₂-Komplex zwei Substratbindestellen besitzt.

3.5 Nachweis des ternären COR-Komplexes

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, die Interaktion der Untereinheiten (BchX)₂ und (BchY/BchZ)₂ nachzuweisen.

Zum Nachweis des ternären Komplexes wurde Trx/His₆/S-getaggttes BchX auf einer S-Agarose-Säule immobilisiert. Zu dem immobilisierten (BchX)₂-Protein wurden gereinigtes (BchY/BchZ)₂, Chlide und MgADP·AlF₄⁻ zugegeben. Nach einer Inkubationsphase und einem Waschschriff wurden alle Proteine mit Hilfe von SDS-Probenpuffer vom Säulenmaterial gelöst. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE – Analyse (Abbildung 19).

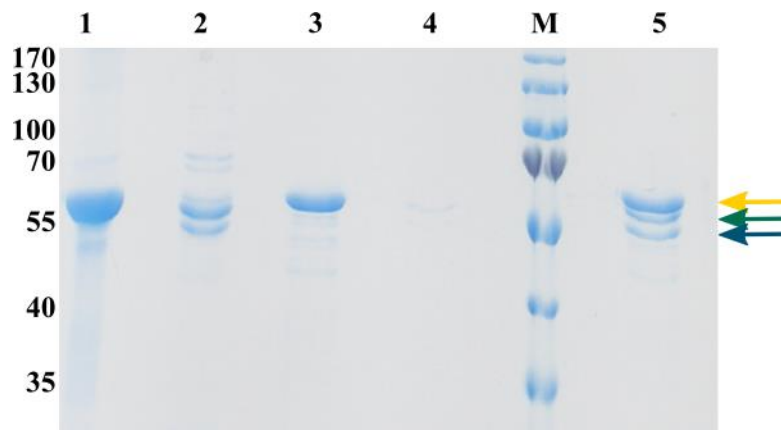


Abbildung 19: Nachweis des ternären COR-Komplexes mit Hilfe eines S-Tags.

SDS-PAGE (2.6.2) von gereinigtem (BchX)₂ und (BchY/BchZ)₂ (2.5.3.1) und der Nachweis des ternären COR-Komplexes mit Hilfe des Trx/His₆/S-Tags von (BchX)₂ über eine S-Agarose-Säule (2.9.1). Die Auftrennung erfolgte in einem 12 %igen SDS-Gel. Zur Visualisierung wurde Instant Blue™ (Expedeon) verwendet (2.6.2). **Spur 1**, 2 µL affinitätschromatographisch-gereinigtes Trx/His₆/S-getaggttes (BchX)₂ über eine mit Ni²⁺ beladene IDA-Sepharose-Säule nach der Elution mit 200 mM Imidazol; **Spur 2**, 10 µL affinitätschromatographisch-gereinigtes (BchY/BchZ)₂ über eine mit Ni²⁺ beladene IDA-Sepharose-Säule nach der Elution mit 200 mM Imidazol (1:1 verdünnt); **Spuren 3 bis 5**, Analyse zum Nachweis des ternären Komplexes in Anwesenheit von MgADP·AlF₄⁻. Das Trx/His₆/S-getaggtte (BchX)₂ wurde auf der S-Agarose immobilisiert und mit MgADP·AlF₄⁻ und (BchY/BchZ)₂ inkubiert. Nach einem Waschschriff wurden alle Proteine durch Behandlung mit SDS-Probenpuffer von dem Säulenmaterial gelöst; **Spur 3 und 4**, Kontrollexperimente in Abwesenheit von (BchY/BchZ)₂ (8 µL, Spur 3) und (BchX)₂ (8 µL, Spur 4); **M**, 5 µL PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), Angabe der relativen Molekülmasse x 1000; **Spur 5**, Nachweis des ternären COR-Komplexes (8 µL), bestehend aus BchX (gelber Pfeil), BchY (grüner Pfeil) und BchZ (blauer Pfeil).

Mittels SDS-PAGE wurde in *Spur 5* ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von $M_r = 53'000$ detektiert. Dies entspricht der berechneten Molekülmasse für das Trx/His₆/S-getaggtte BchX (53'370 Da; Abbildung 19, *Spur 5*, gelber Pfeil). Zum Vergleich wurde gereinigtes Trx/His₆/S-getaggttes BchX ebenfalls auf das Gel aufgetragen (*Spur 1*). Bei dieser Interaktionsstudie wurden zwei weitere Proteine mit den relativen Molekülmassen von $M_r = 56'000$ und $M_r = 53'000$ (*Spur 5*) detektiert. Dies entspricht der berechneten Molekülmasse für das His₆-getaggttes BchY (56'370 Da; *Spur*

5, grüner Pfeil) und für BchZ (53'380; Abbildung 19, *Spur 5*, blauer Pfeil). Als Referenz wurde gereinigtes (BchY/BchZ)₂ ebenfalls auf das Gel aufgetragen (Abbildung 19, *Spur 2*). Zusätzlich wurden alle drei Proteine aus *Spur 5* durch eine N-terminale Sequenzierung analysiert, identifiziert und quantifiziert. Es wurde ein molares Verhältnis von 1.2:0.5:0.3 für BchX zu BchY zu BchZ bestimmt.

Als Kontrolle wurde dasselbe Experiment in Abwesenheit von (BchY/BchZ)₂ (Abbildung 19, *Spur 3*) oder (BchX)₂ (*Spur 4*) durchgeführt. Dadurch konnte eine unspezifische Interaktion des (His₆-BchY/BchZ)₂ mit dem Säulenmaterial ausgeschlossen werden (*Spur 4*).

Dieses Experiment zeigte erstmals eine Interaktion der drei COR-Untereinheiten. Es wurde vermutet, dass (BchX)₂ mit dem (BchY/BchZ)₂-Komplex interagiert und einen oktameren Komplex (BchX)₂(BchY/BchZ)₂(BchX)₂ in Analogie zur DPOR (ChlL)₂(ChlN/ChlB)₂(ChlL)₂ und Nitrogenase (NifH)₂(NifD/NifK)₂(NifH)₂ ausbildet. Die oktamere Struktur der DPOR und Nitrogenase wurde durch dreidimensionale Proteinstrukturen bestätigt. Die heterotetrameren (ChlN/ChlB)₂- und (NifD/NifK)₂-Komplexe stehen in dynamischer Wechselwirkung mit den homodimeren Subkomplexen (ChlL)₂ und (NifH)₂ (Moser *et al.*, 2013; Schindelin *et al.*, 1997). Diese Annahme wurde durch das erhaltene molare Verhältnis aus der N-terminalen Sequenzierung unterstützt. Anhand dieses Ergebnisses wurde vermutet, dass die COR eine ähnliche dynamische Interaktion wie die Nitrogenase und die DPOR durchführt. Vermutlich werden unter ATP-Verbrauch die Elektronen, ausgehend von dem [4Fe-4S]-Cluster der (BchX)₂-Untereinheit, über den [4Fe-4S]-Cluster der (BchY/BchZ)₂-Untereinheit auf das Substrat übertragen. Dabei nutzt (BchX)₂ möglicherweise einen Nukleotid-abhängigen „Switch“-Mechanismus für die Ausbildung eines ternären Proteinkomplexes.

In der vorliegenden Arbeit wurde alternativ das neu klonierte GST-getaggte (BchX)₂-Fusionsprotein auf einer Glutathion-Agarose-Säule immobilisiert. Zu immobilisiertem (BchX)₂ wurden gereinigtes (BchY/BchZ)₂, Chlide und MgADP·AlF₄⁻ zugegeben. Nach einer Inkubationsphase und einem Waschschriff wurde (BchX)₂ proteolytisch mit der PreScission™ Protease von der Säule gespalten. Danach wurden alle Proteine von der Säule eluiert. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE (Abbildung 20).

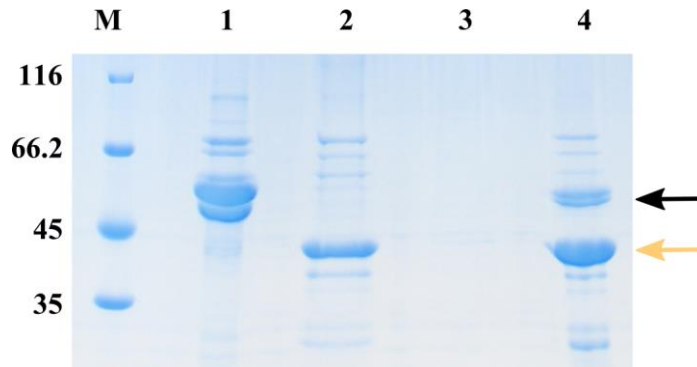


Abbildung 20: Nachweis des ternären COR-Komplexes mit Hilfe eines GST-Tags.

SDS-PAGE (2.6.2) von gereinigtem (BchX)₂ und (BchY/BchZ)₂ (2.5.3.1 und 2.5.3.2) und der Nachweis des ternären COR-Komplexes mit Hilfe des GST-Tags von (BchX)₂ über eine Glutathion-Agarose-Säule (2.9.2). Die Auftrennung erfolgte in einem 12 %igen SDS-Gel. Zur Visualisierung wurde Instant Blue™ (Expedeon) verwendet (2.6.2). **M**, 5 µL Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific), Angabe der relativen Molekülmasse x 1000; **Spur 1**, 1 µL affinitätschromatographisch-gereinigtes His₆-getaggt (BchY/BchZ)₂ über eine mit Ni²⁺ beladene IDA-Sepharose-Säule nach der Elution mit 200 mM Imidazol (1:1 verdünnt); **Spur 2**, 10 µL affinitätschromatographisch-gereinigtes GST-getaggt (BchX)₂ über eine Glutathion-Agarose-Säule und proteolytischer Spaltung mit der PreScission™ Protease; **Spuren 3 und 4**, Analyse zum Nachweis des ternären Komplexes in Anwesenheit von MgADP·AlF₄⁻. Das GST-getaggt (BchX)₂ wurde auf der Glutathion-Agarose immobilisiert und mit MgADP·AlF₄⁻ und (BchY/BchZ)₂ inkubiert. Nach einem Waschschritt wurden alle Proteine proteolytisch mit der PreScission™ Protease gespalten. Nach der Elution wurden die Proben konzentriert (2.5.5) und die Interaktion der COR-Untereinheiten konnte mit Hilfe der SDS-PAGE (2.6.2) nachgewiesen werden; **Spur 3**, 10 µL des Kontrolllexperiments in Abwesenheit von (BchX)₂; **Spur 4**, Nachweis des ternären COR-Komplexes (2 µL), bestehend aus BchX (gelber Pfeil) und (BchY/BchZ)₂ (schwarzer Pfeil).

Mittels SDS-PAGE wurde in *Spur 4* ein Protein mit einer relativen Molekülmasse von $M_r = 37'000$ detektiert. Dies entspricht der berechneten Molekülmasse für BchX (36'600 Da; Abbildung 20, *Spur 4*, gelber Pfeil). Bei dieser Interaktionsstudie wurden zwei weitere Proteine mit ähnlichen Molekülmassen von je $M_r = 53'000$ detektiert (*Spur 4*). Dies entspricht den berechneten Molekülmasse für BchY (53'260 Da) und für BchZ (53'380 Da; *Spur 4*, schwarzer Pfeil). Zum Vergleich wurde gereinigtes His₆-getaggt (BchY/BchZ)₂ ebenfalls auf das Gel aufgetragen (*Spur 1*).

Als Kontrolle wurde dasselbe Experiment in Abwesenheit von (BchY/BchZ)₂ (*Spur 2*) oder (BchX)₂ (*Spur 3*) durchgeführt. Dadurch konnte eine unspezifische Interaktion des (His₆-BchY/BchZ)₂ mit dem Säulenmaterial ausgeschlossen werden (*Spur 3*).

Das BchY-Fusionsprotein verfügt über eine PreScission™-Schnittstelle nach dem N-terminalen His₆-Tag. Durch den Vergleich von *Spur 4* mit *Spur 1* wird deutlich, dass vermutlich der His₆-Tag der BchY-Untereinheit von der PreScission™ Protease abgespalten wurde. Dadurch besitzen BchY und BchZ eine sehr ähnliche Molekülmasse

(Abbildung 20, *Spur 4*, schwarzer Pfeil). Mit Hilfe des GST-getaggten BchX wurde ebenfalls die Interaktion der drei COR-Untereinheiten in Gegenwart von $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4^-$ nachgewiesen.

3.6 BchX-Sequenzanalyse

Die beiden durchgeführten Interaktions-Experimente (3.5) wiesen darauf hin, dass die COR vermutlich einen ähnlichen Nukleotid-abhängigen „Switch“-Mechanismus wie die DPOR und die Nitrogenase besitzt.

In Abbildung 21 ist das in dieser Arbeit erstellte Sequenzalignment in Kombination mit einem Struktur-basierten Sequenzalignment von BchX und BchL/ChlL (Moser *et al.*, 2013) dargestellt.

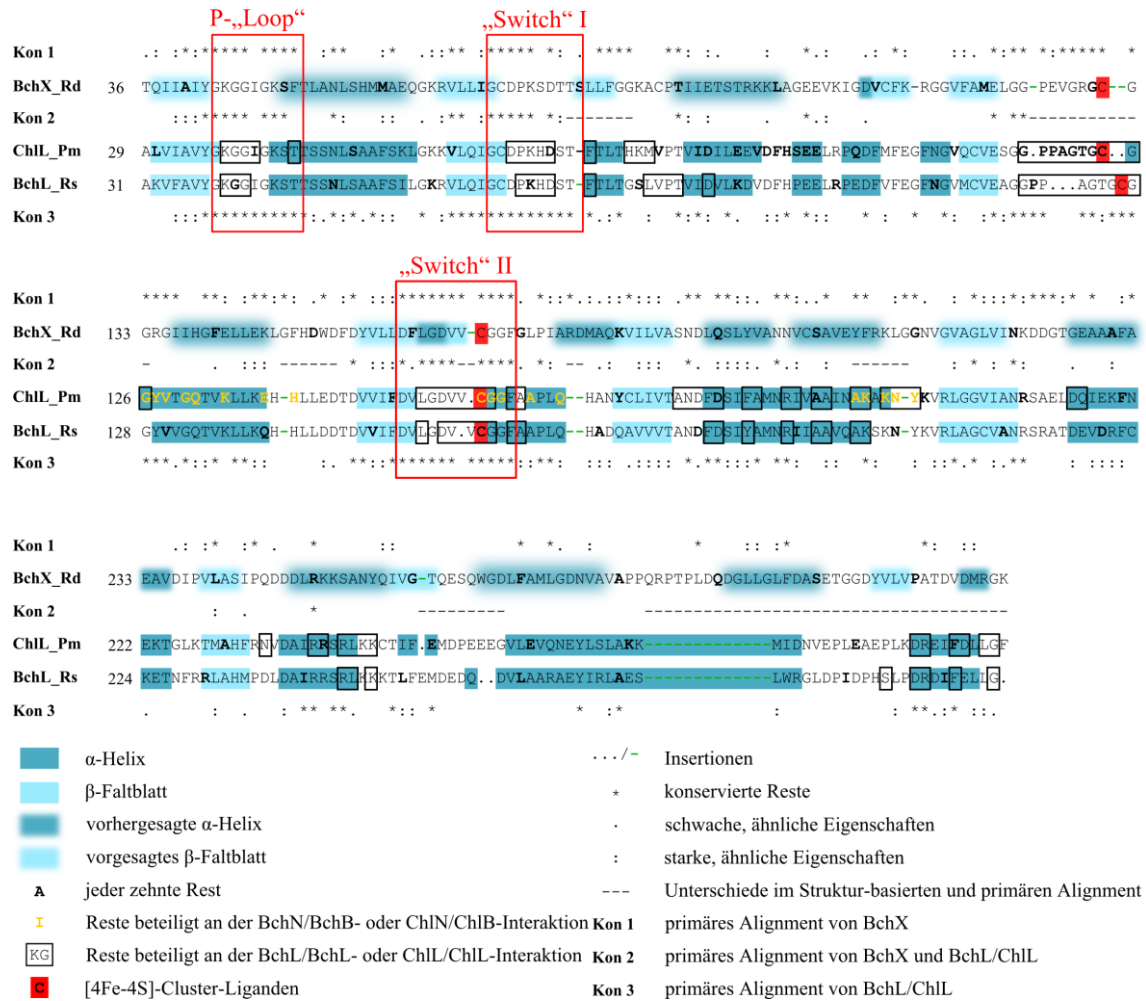


Abbildung 21: Sequenz- und/oder Struktur-basiertes Alignment der BchX- und der BchL/ChlL-Untereinheiten.

Das Struktur-basierte Alignment der ChlL-Untereinheit von *P. marinus* (Pm) und der BchL-Untereinheit von *R. sphaeroides* (Rs) wurde wie in Kapitel 2.6.8 angegeben durchgeführt. α-Helices (dunkelblau) und β-Faltblätter (hellblau) sind dargestellt. Die Vorhersage der Sekundärstruktur für das *R. denitrificans* (Rd) BchX erfolgte mit dem Programm SOPMA (hell- und dunkelblau schattiert).

Die Sequenz-basierten Alignments wurden unter Verwendung von 14 BchX- (Kon 1), 17 BchL/ChlL- (Kon 3) und BchX/BchL/ChlL- (Kon 2)-Sequenzen berechnet. Konservierte Reste und Reste mit ähnlichen Eigenschaften wurden markiert (Stern, Punkt und Doppelpunkt). Diese Sequenz-basierten Konservierungsmuster und das Struktur-basierte Alignment von BchL/ChlL wurden manuell zusammengefügt. Unterschiede in der strukturellen und primären Sequenz sind als (-) dargestellt. Wichtige Reste für die dynamische Protein-Protein-Interaktion von (BchL)₂/(ChlL)₂ und (BchN/BchB)₂/(ChlN/ChlB)₂ sind in Gelb gekennzeichnet. Reste des (BchL)₂/(ChlL)₂ Dimer-„Interface“ sind schwarz umrandet. Liganden des [4Fe-4S]-Clusters von (BchL)₂/(ChlL)₂ und mögliche Liganden für den [4Fe-4S]-Cluster in (BchX)₂ sind rot hinterlegt. Die konservierten Aminosäuren für die „Switch“ I-, „Switch“ II- und die P-„Loop“-Region sind rot umrandet (Moser *et al.*, 2013).

Das Sequenzalignment der BchX-Untereinheit der COR mit der homologen BchL/ChlL-Untereinheit der DPOR zeigte, dass BchX zwei konservierte Cysteine besitzt (Cys-131 und Cys-166; *R. denitrificans* Nummerierung). Diese Cysteine sind vermutlich die

Liganden des [4Fe-4S]-Clusters in der BchX-Untereinheit (Burke *et al.*, 1993b). Vergleichend dazu bilden die entsprechenden konservierten Cys-126 und Cys-160 der DPOR die vier Liganden des [4Fe-4S]-Clusters des (BchL)₂-Dimers aus *R. sphaeroides* (*R. sphaeroides* Nummerierung, Sarma *et al.*, 2008). Dies lässt vermuten, dass im (BchX)₂-Homodimer die beiden Polypeptidketten durch den [4Fe-4S]-Cluster verbunden sind. Das Vorhandensein eines [4Fe-4S]-Clusters zwischen den beiden Hälften des Homodimers wurde auch bei den homologen (ChlL)₂- und (NifH)₂-Homodimeren der DPOR und Nitrogenase beschrieben (Bröcker *et al.*, 2008b; Tezcan *et al.*, 2005).

Im kombinierten Sequenz- und Struktur-basierten Alignment sind die an der Monomer-Monomer-Interaktion beteiligten Aminosäuren von BchL bzw. ChlL schwarz umrandet (Moser *et al.*, 2013). Beim Vergleich der entsprechenden Aminosäuren in der BchX-Untereinheit wird deutlich, dass diese Reste zum größten Teil konserviert vorliegen. Es wurde vermutet, dass diese konservierten Reste in BchX an der Interaktion des (BchX)₂-Dimers beteiligt sein könnten. Im Alignment (Abbildung 21) sind die an der ATP-Hydrolyse und dem „Switch“-Mechanismus der DPOR beteiligten Reste rot umrandet (Moser *et al.*, 2013). Für die ATP-Hydrolyse sind Lys-37, Asp-155 und der P-„Loop“ (Gly-36–Thr-44) von Bedeutung (*P. marinus* Nummerierung). Für den an der Signalübertragung beteiligten „Switch“-Mechanismus von (BchL)₂/(ChlL)₂ sind die „Switch“ I-Region (Gly-64–Thr-72), der „docking loop“ (Ile-84–Glu-96) und die „Switch“ II-Region (Asp-151–Phe-161 und Cys-158) wichtig (*P. marinus* Nummerierung; Moser *et al.*, 2013). Beim Vergleich der entsprechenden Aminosäuren in der BchX-Untereinheit wird deutlich, dass diese Sequenzbereiche weitgehend konserviert vorliegen. Somit wurde vermutet, dass BchX für die COR-Katalyse ebenfalls einen dynamischen „Switch“-Mechanismus benutzt.

3.7 (BchY/BchZ)₂ koordiniert zwei nicht identische [4Fe-4S]-Cluster

In der vorliegenden Arbeit sollte mittels UV/Vis- und EPR-Spektroskopie der [Fe-S]-Cluster der (BchY/BchZ)₂-Untereinheit charakterisiert werden.

3.7.1 UV/Vis-Spektroskopie von (BchY/BchZ)₂

In der vorliegenden Arbeit wurde der (BchY/BchZ)₂-Subkomplex, wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben, gereinigt. Anschließend wurde der (BchY/BchZ)₂-Subkomplex mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie analysiert (Abbildung 22).

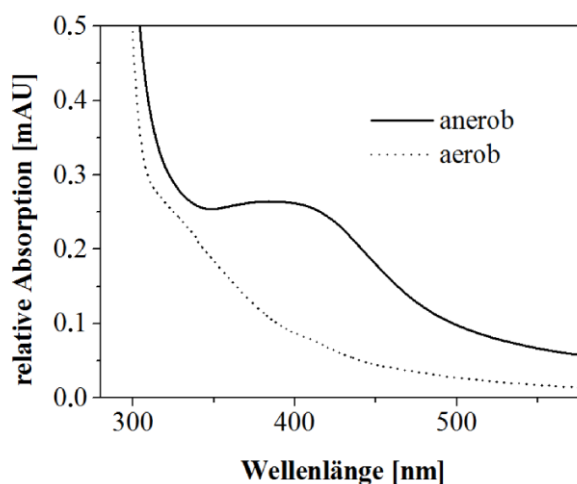


Abbildung 22: UV/Vis-Spektroskopie von (BchY/BchZ)₂.

UV/Vis-Absorptionsanalyse von ko-gereinigtem (BchY/BchZ)₂ unter anaeroben Bedingungen (durchgezogene Linie) und nach aerober Inkubation (gepunktete Linie);

Im UV/Vis-Spektrum ist ein Maximum der Absorption bei 410 nm zu erkennen (Abbildung 22, *durchgezogene Linie*). Gleichzeitig wurde eine deutliche Braunfärbung der Probe beobachtet. Ein Absorptionsmaximum bei 410 nm ist charakteristisch für einen [4Fe-4S]-Cluster (Duin *et al.*, 1997). Dieser Absorptionsspeak verschwand, nachdem die Probe über Nacht atmosphärischem Sauerstoff ausgesetzt wurde (*gepunktetes Spektrum*). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für den homologen [4Fe-4S]-Cluster von (ChlN/ChlB)₂ der DPOR aus *P. marinus* und dem P-Cluster aus verschiedenen Nitrogenasen beschrieben (Bröcker *et al.*, 2008b; Wiig *et al.*, 2011).

Die kolorimetrische Bestimmung des Eisen-Gehalts ergab 6 mol Eisen pro mol (BchY/BchZ)₂ (2.6.6). Daneben wurde die Konzentration an [4Fe-4S]-Clustern im (BchY/BchZ)₂-Heterotetramer mit Hilfe der Absorption bei 410 nm unter Berücksichtigung eines Extinktionskoeffizienten für [4Fe-4S]-Cluster (15 mM⁻¹ cm⁻¹, Hänzelmann *et al.*, 2004, Shen *et al.*, 2007) berechnet. Dadurch ergab sich ein Gehalt von

1.4 mol [4Fe-4S]-Cluster pro mol (BchY/BchZ)₂. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass zwei [4Fe-4S]-Cluster in der heterotetrameren (BchY/BchZ)₂-Untereinheit der COR vorhanden sind.

3.7.2 EPR-Analyse von (BchY/BchZ)₂

Um die Annahme von zwei [4Fe-4S]-Clustern in (BchY/BchZ)₂ zu verifizieren, wurden EPR-Messungen durchgeführt (Abbildung 23).

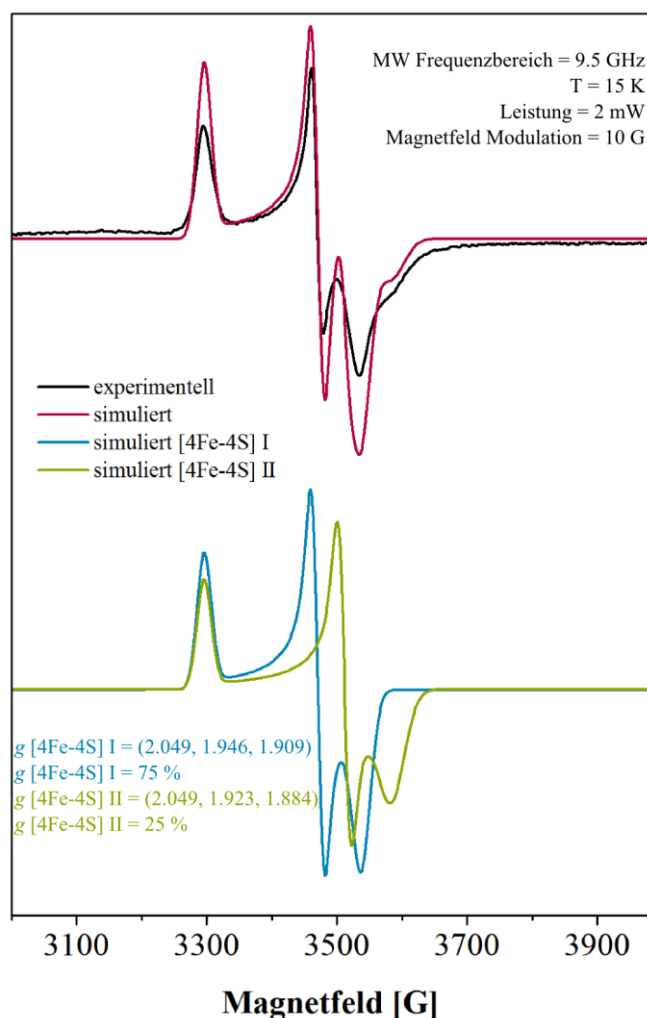


Abbildung 23: EPR-Spektroskopie von (BchY/BchZ)₂.

EPR-Spektrum des (BchY/BchZ)₂-Komplexes nach der Reduktion mit 12.5 mM NDT (schwarze Linie) und die simulierten Spektren (rotes, blaues und grünes Spektrum). Der verwendete MW Frequenzbereich, die Temperatur, die Leistung und Modulation des Magnetfeldes sind angegeben. Die g-Werte wurden anhand der entsprechenden Simulation berechnet. Das Spektrum von (BchY/BchZ)₂ zeigt die Überlagerung von zwei nicht identischen [4Fe-4S]-Clustern.

Diese Analysen erfolgten durch Dr. Edward Reijerse, Leiter der Arbeitsgruppe „Bio Hydrogen“ am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion (Mülheim an der Ruhr).

Nach der Reduktion mit NDT ergab sich ein fast quantitatives $S = 1/2$ EPR-Signal für $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster. Die Simulation des erhaltenen EPR-Spektrums war durch die Überlagerung von zwei EPR-Signalen, $[4\text{Fe-4S}]$ I und $[4\text{Fe-4S}]$ II, möglich. Beide Signale zeigten unterschiedliche g -Werte und das Verhältnis der Intensitäten betrug 75 % zu 25 %. Die g -Werte für den ersten Cluster betrugen $g_1 = 2.049$, $g_2 = 1.946$ und $g_3 = 1.909$ ($[4\text{Fe-4S}]$ I). Für den zweiten Cluster ergaben sich die g -Werte $g_1 = 2.049$, $g_2 = 1.923$ und $g_3 = 1.884$ ($[4\text{Fe-4S}]$ II, Abbildung 23). Die erhaltenen Daten aus der EPR-Messung lagen im erwarteten Bereich für einen reduzierten $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster (Guigliarelli & Bertrand, 1999; Mouesca & Lamotte, 1998). Die verschiedenen g -Werte für $[4\text{Fe-4S}]$ I und $[4\text{Fe-4S}]$ II sind möglicherweise auf geringfügige Unterschiede in der spezifischen Cluster-Koordination zurückzuführen. Eine ähnliche Cluster-Koordination wurde für $(\text{ChlN/ChlB})_2$ aus *P. marinus* beobachtet (Bröcker *et al.*, 2008b).

Für die analysierte $(\text{BchY/BchZ})_2$ -Probe wurden keine höheren Spin-Zustände ($S = 3/2$ oder $S = 5/2$) beobachtet. Dies stimmt mit den EPR-Ergebnissen für $(\text{ChlN/ChlB})_2$ aus *P. marinus* überein (Bröcker *et al.*, 2008b). Dagegen wurde für das $(\text{BchN/BchB})_2$ aus *R. capsulatus* ein $S = 3/2$ Spin-Zustand beobachtet (Kondo *et al.*, 2011). Es wurde vermutet, dass eine unterschiedliche strukturelle Anordnung der Cluster-Liganden das Zusammenspiel der Eisen-Atome beeinflussen könnte. Die elektronischen Grundzustände der Cluster würden sich dadurch unterscheiden. Für $(\text{BchN/BchB})_2$ aus *R. capsulatus* wurde beobachtet, dass durch gebundenes Chl *c* ein anderer Spin-Zustand detektiert wurde (Kondo *et al.*, 2011). Ähnliche Beobachtungen wurden bei EPR-Messungen einer $(\text{BchN/BchB})_2$ -Mutante aus *R. capsulatus* gemacht. In der $(\text{BchN/BchB})_2$ -Mutante wurde der vierte Aspartat-Ligand gegen ein Cystein ausgetauscht. Die D36C-Mutante zeigte keine enzymatische Aktivität, jedoch wurde mittels der Proteinstruktur und EPR-Messungen ein $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster nachgewiesen (*R. capsulatus* Nummerierung; Kondo *et al.*, 2011; Muraki *et al.*, 2010). Bei den EPR-Messungen wurde zusätzlich beobachtet, dass der artifizielle Ligand der D36C-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Protein einen Einfluss auf den Spin-Zustand hat

(Kondo *et al.*, 2011). Es ist auch bekannt, dass Lösungsmittel einen Einfluss auf den Spin-Übergang zwischen niedrigen und hohen Zuständen haben können (Conover *et al.*, 1990; Hagen *et al.*, 1985; Lindahl *et al.*, 1985; Onate *et al.*, 1993).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die COR-Untereinheit (BchY/BchZ)₂ in Analogie zur DPOR einen [4Fe-4S]-Cluster für den direkten Transfer der Elektronen von (BchX)₂ auf das Substrat Chlide besitzt.

3.8 Mutagenese der potentiellen Liganden des [4Fe-4S]-Clusters von (BchY/BchZ)₂

3.8.1 Cys-62, Cys-87, Cys-145 in BchY und Cys-35 in BchZ koordinieren den [4Fe-4S]-Cluster

Für das (BchY/BchZ)₂-Heterotetramer wurde anhand von Sequenzalignments mit NifD und NifK der Nitrogenase sowie BchN/ChlN und BchB/ChlB der DPOR ein Metallo-Cluster vorhergesagt, welcher durch vier Cysteine ligandiert wird. Damit würde sich die COR von dem in der Nitrogenase vorhandenen P-Cluster mit sechs koordinierenden Cysteinen und dem [4Fe-4S]-Cluster der DPOR mit drei Cystein- und einem vierten Aspartat-Liganden unterscheiden (Bröcker *et al.*, 2010a; Nomata *et al.*, 2006b; Wätzlich *et al.*, 2009).

Aus den Sequenzalignments konnten für die BchY-Untereinheit die konservierten Cystein-Reste Cys-62, Cys-87 und Cys-145 als mögliche Cluster-Liganden identifiziert werden. Es wurde vermutet, dass sie den DPOR-Liganden Cys-17, Cys-41 und Cys-103 des [4Fe-4S]-Clusters in *P. marinus* entsprechen (Anhang 2). Jedoch konnte kein Äquivalent für den ungewöhnlichen Aspartat-Liganden der DPOR von BchB/ChlB in BchZ gefunden werden (Anhang 3). Die konservierten Aminosäuren Cys-86 in BchY sowie Asp-30 und Cys-35 in BchZ könnten auch als mögliche Cluster-Liganden fungieren. Um die Frage nach den Cluster-Liganden der COR zu klären, wurden in den folgenden Mutageneseexperimenten Cys-62, Cys-86, Cys-87 und Cys-145 in BchY sowie Asp-30 und Cys-35 in BchZ mutagenisiert (Anhang 2 und Anhang 3). Um den Einfluss der mutagenisierten Liganden auf den [4Fe-4S]-Cluster zu untersuchen, wurde

von allen COR-Mutanten der Eisen-Gehalt bestimmt (2.6.6). Weiterhin wurden zusätzlich EPR-Messungen für die entsprechenden Mutanten-Proteine durchgeführt (2.6.7).

Mit Hilfe von ortsgerichteter Mutagenese erfolgte der Austausch jeweils eines konservierten Cysteins in der BchY-Untereinheit. Dabei wurde an den Positionen 62, 86, 87 und 145 ein Cystein durch ein Alanin ausgetauscht (2.4.9). Anschließend wurden die gereinigten Proteinkomplexe im gekoppelten *in vitro* Enzymaktivitätstest analysiert (Abbildung 24).

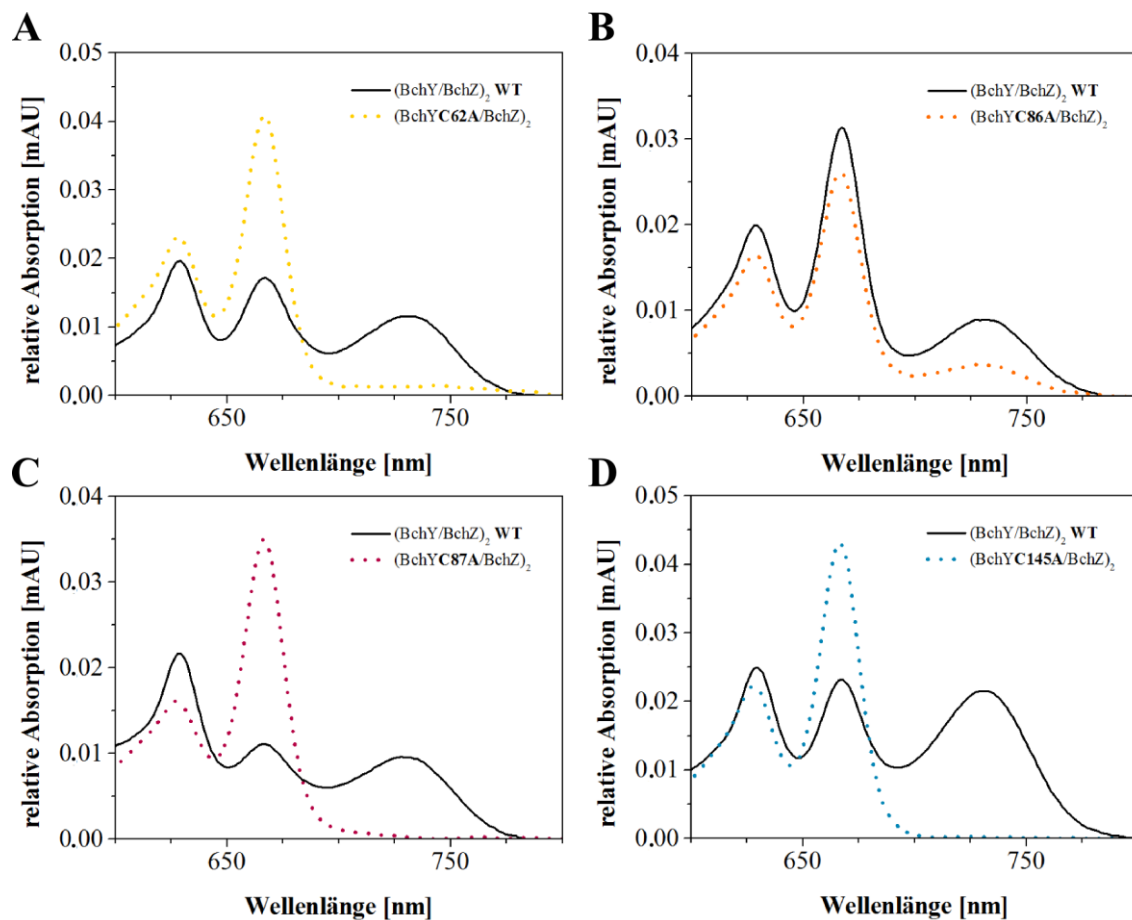


Abbildung 24: *In vitro* gekoppelter DPOR/COR-Aktivitätstest mit den durch ortsgerichtete Mutagenese erstellten BchY-Mutanten.

UV/Vis-Spektren eines gekoppelten DPOR/COR-Aktivitätstests nach Extraktion der Pigmente mit Aceton. Absorptionsmaxima der Pigmente wurden für Pchl bei 628 nm, für Chl bei 667 nm und für Bchl bei 734 nm beobachtet (2.7.2). Dargestellt ist die Aktivität des Wildtyps (BchY/BchZ)₂ (schwarzes Spektrum) im Vergleich zu den verschiedenen mutagenisierten Proteinkomplexen (farbige, gepunktete Spektren). **A**, Austausch Cys-62 gegen Ala in BchY; **B**, Austausch Cys-86 gegen Ala in BchY; **C**, Austausch Cys-87 gegen Ala in BchY; **D**, Austausch Cys-145 gegen Ala in BchY.

Für die Mutanten C62A, C87A und C145A konnte keine messbare Aktivität detektiert werden (Abbildung 24 A, C und D). Der für diese BchY-Mutanten bestimmte Eisen-Gehalt (2.6.6) war auf Werte von 63 % (C62A), 21 % (C87A) und 26 % (C145A) im Vergleich zum Wildtyp-Protein gesunken (Tabelle 9).

Tabelle 9: Charakterisierung der mutagenisierten (BchY/BchZ)₂-Untereinheiten

Enzymatische Aktivitäten und der Eisen-Gehalt der verschiedenen mutagenisierten COR-Untereinheiten BchY und BchZ. Der [4Fe-4S]-Cluster des (BchY/BchZ)₂-Komplexes wird vermutlich von vier Cysteinen koordiniert. Die enzymatische Aktivität und der Eisen-Gehalt der Wildtyp *R. denitrificans* COR entspricht 100 %. Aktivitäten unterhalb der Nachweisgrenze wurden als nicht detektierbar (n. d.) gekennzeichnet.

COR Untereinheit	Theoretischer [4Fe-4S] Ligand	[4Fe-4S] koordinierende Cys	Mutation	Spezifische Aktivität [%]	Eisen-Gehalt [%]
BchY	Cys-62	+	C62A	n. d.	63±6
	Cys-86		C86A	50±12	100±8
	Cys-87	+	C87A	n. d.	21±4
	Cys-145	+	C145A	n. d.	26±4
BchZ	Asp-30	+	D30C	60±28	96±5
	Cys-35		C35A	n. d.	73±6
			C35S	n. d.	100±13
			C35D	n. d.	100±6
			C35D/S94C	n. d.	95±12

Im Vergleich dazu zeigte der mutagenisierte C86A-Enzymkomplex zum Wildtyp einen Eisen-Gehalt von 100 % (Tabelle 9). Gleichzeitig wurde jedoch eine Reduktion der spezifischen Aktivität auf 50 % beobachtet (Tabelle 9 und Abbildung 24 B). Vermutlich ist in dieser Mutante ein [4Fe-4S]-Cluster vorhanden, jedoch wird durch die Mutation die Aktivität der COR deutlich beeinflusst. Zur Überprüfung des postulierten [4Fe-4S]-Clusters der C86A-Mutante wurde dieser mit Hilfe von EPR-Spektroskopie (2.6.7) weiter untersucht (Abbildung 25).

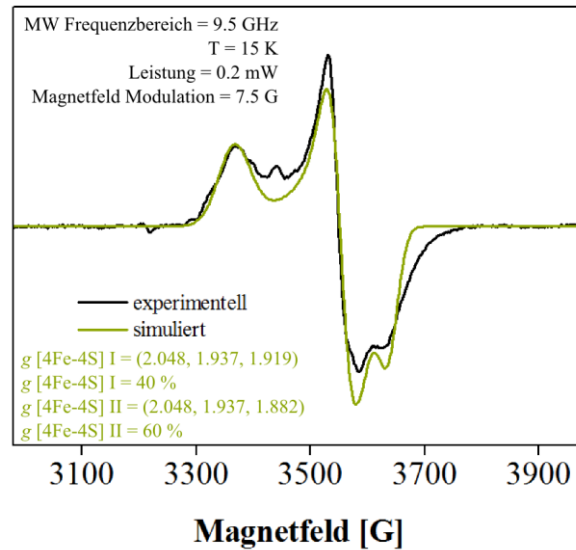


Abbildung 25: EPR-Spektrum der (BchYC86A/BchZ)₂-Mutante.

EPR-Spektrum der (BchYC86A/BchZ)₂-Mutante nach Reduktion mit 12.5 mM NDT (schwarze Linie) und das aus den experimentellen Werten ermittelte Simulationsspektrum (grünes Spektrum). Der verwendete MW Frequenzbereich, die Temperatur, die Leistung und Modulation des Magnetfeldes sind angegeben. Die *g*-Werte wurden anhand der entsprechenden Simulation berechnet. Spektrum der BchY-Mutante durch Austausch von Cys-86 gegen Ala. Das Spektrum der Mutante zeigt eine Überlagerung von zwei nicht identischen [4Fe-4S]-Clustern.

Das erhaltene EPR-Spektrum in Abbildung 25 zeigte nach der Reduktion mit NDT ein charakteristisches [4Fe-4S]¹⁺-EPR-Signal mit einem Spin-Zustand von $S = 1/2$ (Guigliarelli & Bertrand, 1999; Mouesca & Lamotte, 1998). Die Simulation des erhaltenen EPR-Spektrums wurde auch in diesem Fall durch die Überlagerung von zwei EPR-Signalen, [4Fe-4S] I und [4Fe-4S] II, möglich. Beide Signale zeigten unterschiedliche *g*-Werte, und das Verhältnis der Intensitäten betrug 40 % zu 60 %. Die *g*-Werte für den ersten Cluster lagen bei $g_1 = 2.048$, $g_2 = 1.937$ und $g_3 = 1.919$ ([4Fe-4S] I). Für den zweiten Cluster ergaben sich die *g*-Werte $g_1 = 2.048$, $g_2 = 1.937$ und $g_3 = 1.882$ ([4Fe-4S] II, Abbildung 25 A). Die erhaltenen Daten aus der EPR-Messung stimmen sehr gut mit den EPR-Ergebnissen für den Wildtyp-Proteinkomplex überein.

Die dargestellten Resultate der Aktivitätstests und EPR-Messungen bekräftigen die Annahme, dass die Aminosäuren Cys-62, Cys-87 und Cys-145 von BchY am Aufbau des [4Fe-4S]-Clusters des (BchY/BchZ)₂-Komplexes beteiligt sind und somit essentiell einen Einfluss auf die Redox-Katalyse der COR haben.

Die hoch konservierten Aminosäuren Asp-30 und Cys-35 der BchZ-Untereinheit wurden als potenzielle vierte Liganden des [4Fe-4S]-Clusters vorgeschlagen (Anhang 3). Mit Hilfe von ortsgerichteter Mutagenese wurde Asp-30 in ein Cystein mutagenisiert (2.4.9). Dagegen wurde Cys-35 gegen Alanin, Serin und Aspartat ausgetauscht. Anschließend wurden die gereinigten Proteinkomplexe im gekoppelten *in vitro* Enzymaktivitätstest analysiert (Abbildung 26).

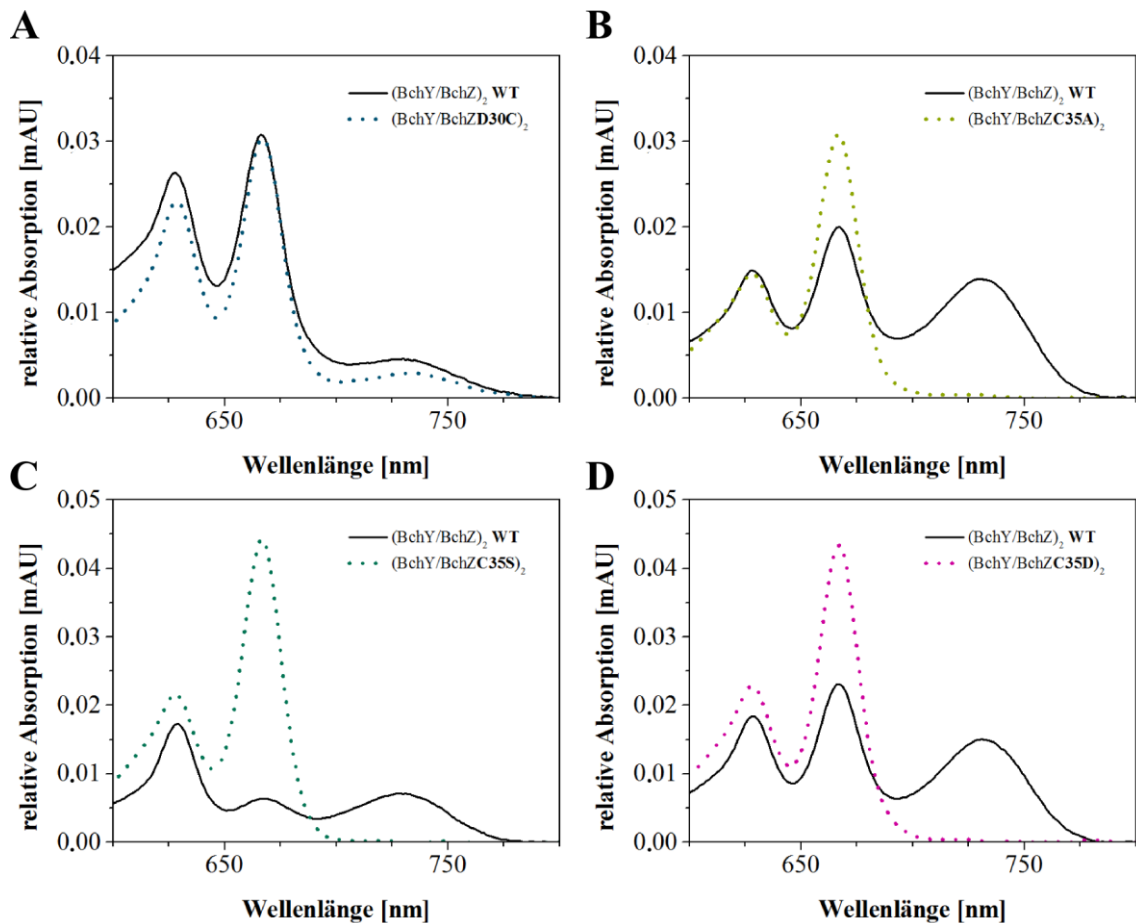


Abbildung 26: *In vitro* gekoppelter DPOR/COR-Aktivitätstest mit den durch ortsgerichtete Mutagenese erstellten BchZ-Mutanten.

UV/Vis-Spektren eines gekoppelten DPOR/COR-Aktivitätstests nach Extraktion der Pigmente mit Aceton. Absorptionsmaxima der Pigmente wurden für Pchl bei 628 nm, für Chl bei 667 nm und für Bchl bei 734 nm beobachtet (2.7.2). Dargestellt ist die Aktivität des Wildtyps ($(\text{BchY/BchZ})_2$) (schwarzes Spektrum) im Vergleich zu den verschiedenen mutagenisierten Proteinkomplexen (farbige, gepunktete Spektren). **A**, Austausch Asp-30 gegen Cys in BchZ; **B-D**, Austausch Cys-35 gegen Ala, Ser und Asp in BchZ.

Die Analyse der D30C-Mutante resultierte im gekoppelten DPOR/COR-Aktivitätstest (2.7.2) in einer Abnahme der Aktivität auf 60 % im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 26 A und Tabelle 9). Es wurde ein Eisen-Gehalt von 96 % im Vergleich zum Wildtyp

beobachtet (Tabelle 9). Vermutlich ist in dieser Mutante ein [4Fe-4S]-Cluster vorhanden. Zur Überprüfung des [4Fe-4S]-Clusters der D30C-Mutante wurde dieser mit Hilfe der EPR-Spektroskopie (2.6.7) charakterisiert (Abbildung 27).

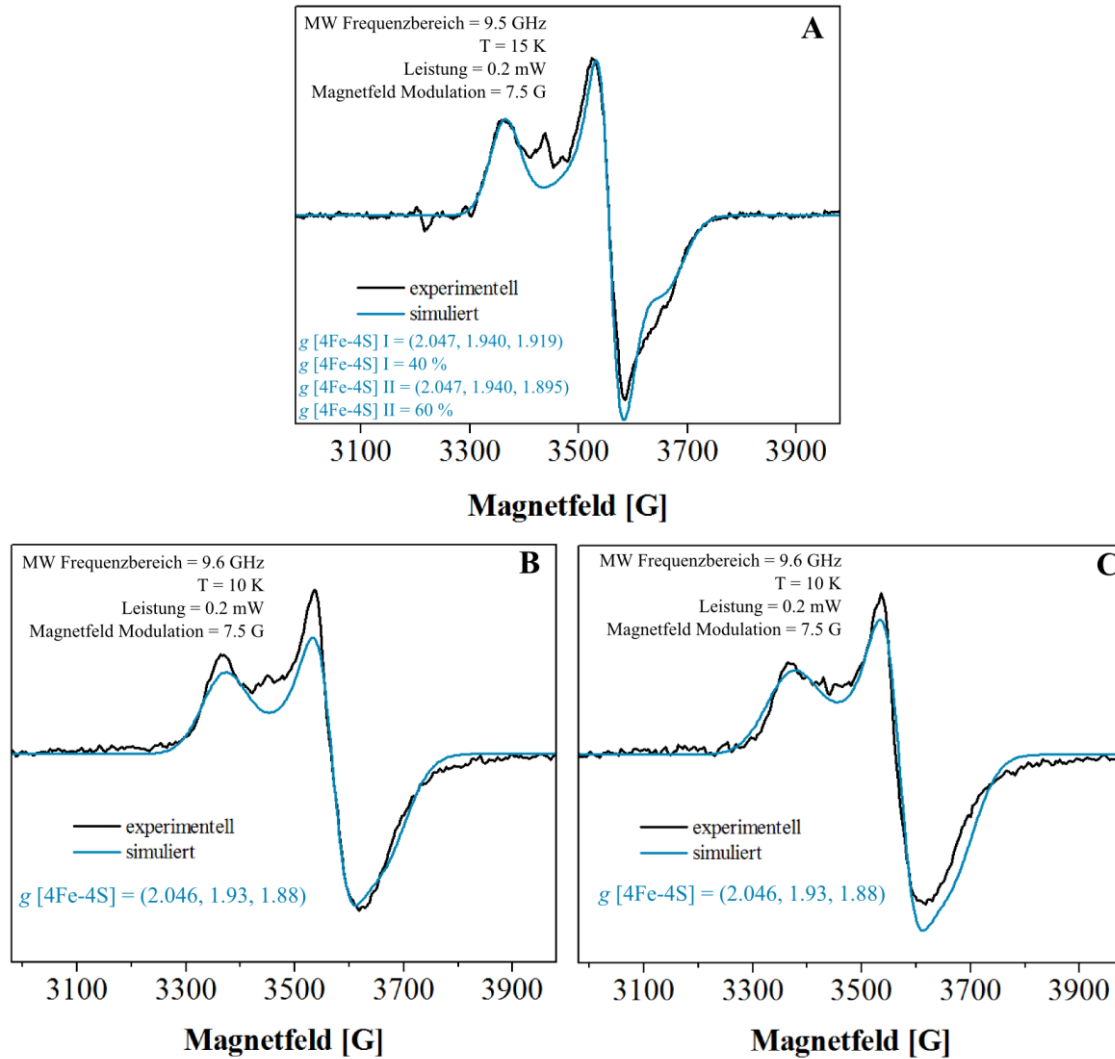


Abbildung 27: EPR-Spektren der (BchY/BchZD30C)₂-, (BchY/BchZC35S)₂- und (BchY/BchZC35D)₂-Mutante.

EPR-Spektren der (BchY/BchZ)₂-Mutanten nach Reduktion mit 12.5 mM NDT (schwarze Linie) und die aus den experimentellen Werten ermittelten Simulationsspektren (blaue Spektren). Der verwendete MW Frequenzbereich, die Temperatur, die Leistung und Modulation des Magnetfeldes sind angegeben. Die g -Werte wurden anhand der entsprechenden Simulation berechnet. **A**, Spektrum der BchZ-Mutante durch Austausch von Asp-30 gegen Cys. Das Spektrum der Mutante zeigt eine Überlagerung von zwei nicht identischen [4Fe-4S]-Clustern. **B**, Spektrum der BchZ-Mutante durch Austausch von Cys-35 gegen Ser; **C**, Spektrum der BchZ-Mutante durch Austausch von Cys-35 gegen Asp. Die Spektren der beiden Mutanten zeigen ein [4Fe-4S]¹⁺-Cluster-Signal.

Für die D30C-Mutante wurde nach der Reduktion mit NDT ein spezifisches $S = 1/2$ [4Fe-4S]¹⁺-Signal in der EPR-Messung beobachtet (Abbildung 27 A). Die D30C-

Mutante zeigte ein ähnliches EPR-Ergebnis wie das Wildtyp-Protein und die C86A-Mutante. Jedoch lag das Verhältnis der Intensitäten der unterschiedlichen g -Werte, ebenso wie bei der C86A-Mutante, bei 40 % zu 60 %. Die Simulation des erhaltenen EPR-Spektrums wurde auch in diesem Fall durch die Überlagerung von zwei EPR-Signalen, [4Fe-4S] I und [4Fe-4S] II, ermöglicht. Die g -Werte für den ersten gemessenen Cluster lagen bei $g_1 = 2.047$, $g_2 = 1.940$ und $g_3 = 1.919$ ([4Fe-4S] I). Für den zweiten Cluster ergaben sich die g -Werte $g_1 = 2.047$, $g_2 = 1.940$ und $g_3 = 1.895$ ([4Fe-4S] II, Abbildung 25 B).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten die C35A, C35S und C35D-Mutanten der BchZ-Untereinheit keinerlei enzymatische Aktivitäten (Abbildung 26 B bis D und Tabelle 9). Unterschiede zeigten sich beim Eisen-Gehalt. Hierbei wurde für die C35A-Mutation ein Eisen-Gehalt von 73 % im Vergleich zum Wildtyp-Proteinkomplex gemessen, wohingegen die C35S-Mutation und C35D-Mutation 100 % Eisen-Gehalt aufwiesen (Tabelle 9). Somit wurde vermutet, dass mit der isosteren C35S-Mutation oder der C35D-Mutation ein Serin- oder Aspartat-Ligand für die Koordination des [4Fe-4S]-Clusters der COR zur Verfügung steht. Zur Bestätigung erfolgten mit diesen mutierten (BchY/BchZ)₂-Komplexen ebenfalls EPR-Messungen (2.6.7).

Auch für die C35S-Mutation wurde nach der Reduktion mit NDT ein charakteristisches $S = 1/2$ [4Fe-4S]¹⁺ Cluster-Signal im EPR-Spektrum beobachtet (Abbildung 27 B). Dabei lagen die g -Werte bei $g_1 = 2.046$, $g_2 = 1.93$ und $g_3 = 1.88$. Für die C35D-Mutation wurde nach der Reduktion mit NDT ein schwaches $S = 1/2$ [4Fe-4S]¹⁺-Cluster-Signal in der EPR-Messung beobachtet (Besetzung der Spin-Zustände bei ungefähr 10 %). Die g -Werte lagen bei $g_1 = 2.046$, $g_2 = 1.93$ und $g_3 = 1.88$ (Abbildung 27 C). Bei den EPR-Messungen der Mutanten C35S und C35D wurden keine Hinweise auf einen höheren Spin-Zustand beobachtet. Diese spektroskopischen Daten lassen vermuten, dass der [4Fe-4S]-Cluster von (BchY/BchZ)₂ durch drei Cysteine und ein Aspartat koordiniert sein könnte. Jedoch zeigte dieser artifizielle Cluster keine enzymatische Aktivität.

In der Literatur werden verschiedene artifizielle Cluster beschrieben. Die Substitution eines Cystein-Restes durch ein Serin, im ungewöhnlichen [8Fe-7S]-Cluster (P-Cluster) der Nitrogenase von *A. vinelandii*, führte zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität. Die entsprechenden EPR-Messungen der Mutante zeigten jedoch, dass durch diese Mutation ein intakter P-Cluster vorhanden war (May *et al.*, 1991). Ähnliche Effekte

wurden auch für die (BchN/BchB)₂-Untereinheit der DPOR in *R. capsulatus* beschrieben. Die Substitutionen des Aspartat-Liganden von BchB in ein Alanin, Serin oder Cystein zeigten sehr geringe oder keine enzymatische Aktivität. Jedoch konnten in den entsprechenden Kristallstrukturen ein entsprechender [4Fe-4S]-Cluster beobachtet werden. In EPR-Messungen der Cystein-Mutante wurde ebenfalls ein [4Fe-4S]-Cluster detektiert (Kondo *et al.*, 2011; Muraki *et al.*, 2010).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Cys-35 der vierte Ligand des [4Fe-4S]-Clusters des (BchY/BchZ)₂-Komplexes der COR ist. Demnach wird der [4Fe-4S]-Cluster von (BchY/BchZ)₂ durch vier Cysteine koordiniert.

3.8.2 Umwandlung der COR-Cluster-Liganden in das DPOR-ähnliche Liganden-Muster

In einem weiteren Mutageneseexperiment wurde das Liganden-Muster der katalytischen (BchN/BchB)₂-Untereinheit der DPOR auf (BchY/BchZ)₂ übertragen (2.4.9).

Biochemische und strukturelle Untersuchungen zur DPOR zeigten, dass Cys-95 (*P. marinus* Nummerierung) für die Stabilisierung des [4Fe-4S]-Clusters in der (ChlN/ChlB)₂-Untereinheit der DPOR benötigt wird (Bröcker *et al.*, 2008a; Moser *et al.*, 2013; Muraki *et al.*, 2010). Auf der Grundlage von Sequenzalignments wurde Ser-94 als potenzieller Cluster-stabilisierender Ligand in Anlehnung an Cys-95 in Betracht gezogen (*P. marinus* Nummerierung, Anhang 3). Mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese wurde Ser-94 in ein Cystein mutagenisiert (2.4.9). Der daraus entstandene doppelt mutagenisierte Enzymkomplex C35D/S94C wurde kinetisch und mittels EPR untersucht (Abbildung 28).

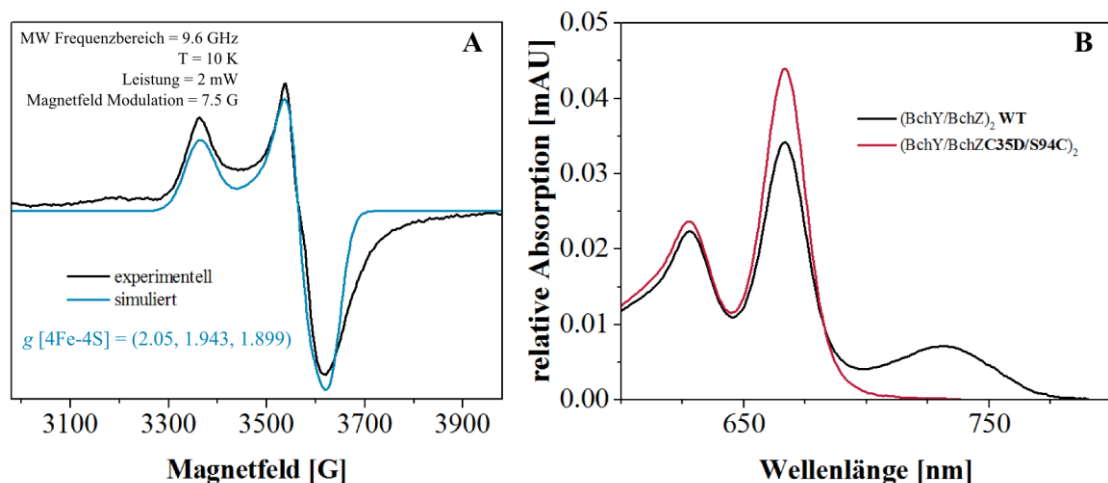


Abbildung 28: EPR-Spektroskopie und ein *in vitro* gekoppelter DPOR/COR-Aktivitätsnachweis der (BchY/BchZC35D/S94C)-Mutante.

A, EPR-Spektren der (BchY/BchZC35D/S94C)₂-Mutante nach Reduktion mit 12.5 mM NDT (schwarze Linie) und das aus den experimentellen Werten ermittelte Simulationsspektrum (blaues Spektrum). Der verwendete MW Frequenzbereich, die Temperatur, die Leistung und Modulation des Magnetfeldes sind angegeben. Die *g*-Werte wurden anhand der experimentellen Daten berechnet. Das EPR-Spektrum zeigt ein [4Fe-4S]¹⁺-Cluster-Signal. **B**, UV/Vis-Spektrum eines gekoppelten DPOR/COR-Aktivitätstests nach Extraktion der Pigmente mit Aceton. Absorptionsmaxima der Pigmente wurden für Pchl_a bei 628 nm, für Chl_a bei 667 nm und für Bchl_a bei 734 nm beobachtet (2.7.2). Dargestellt ist die Aktivität des Wildtyps (BchY/BchZ)₂ (schwarzes Spektrum) im Vergleich zu der C35D/S94C-Mutante (rotes Spektrum).

Das EPR-Signal für die C35D/S94C-Mutante zeigte nach der Reduktion mit NDT ein deutliches [4Fe-4S]¹⁺-Cluster-Signal mit einem Spin-Zustand von $S = 1/2$ (Abbildung 28 A). Es ergaben sich die *g*-Werte $g_1 = 2.05$, $g_2 = 1.934$ und $g_3 = 1.899$.

Die EPR-Ergebnisse C35D/S94C-Mutante zeigten keinerlei Hinweise auf einen höheren Spin-Zustand. Ähnliche Ergebnisse konnten in einer Mutagenesestudie für das Ferredoxin aus *A. vinelandii* beobachtet werden. Der Cluster mit vier Cystein-Liganden hatte vor und nach dem Aspartat-Austausch einen Spin-Zustand von $S = 1/2$ (Jung *et al.*, 2000). Basierend auf den EPR-Ergebnissen für (BchY/BchZC35D/S94C)₂ wurde vermutet, dass in dieser Doppelmutante ein zur DPOR-ähnliches Liganden-Muster mit drei Cystein- und einem Aspartat-Liganden vorliegt. Diese Doppelmutante zeigte jedoch keinerlei enzymatische Aktivität (Abbildung 28 B und Tabelle 9). Möglicherweise beeinflusst das Liganden-Muster die Redox-Eigenschaften des [4Fe-4S]-Clusters.

Es ist bekannt, dass [Fe-S]-Cluster in unterschiedlichen Redox-Proteinen verschiedene Redox-Potentiale besitzen (Bak & Elliott, 2014). Es wurden auch Studien veröffentlicht,

die eine Veränderung des Redox-Potentials nach Mutagenese eines Cluster-Liganden zeigen konnten. Zum Beispiel wurde der Einfluss eines mutagenisierten Liganden (Austausch eines Cysteins gegen ein Aspartat) auf das Redox-Potential des [4Fe-4S]-Clusters F_A von PsaC untersucht. PsaC ist die ins Stroma ragende Untereinheit des Photosystems I. PsaC-C51D zeigte eine Reduktion des Redox-Potentials von -520 mV auf -630 mV (Yu *et al.*, 1995). Bei Veränderung des Liganden-Musters für den [4Fe-4S]-Cluster des Ferredoxins aus *Pyrococcus furiosus* zeigte sich dagegen, dass beim Austausch eines Aspartats gegen ein Cystein das Redox-Potential von -375 mV auf -422 mV erniedrigt wird (Zhou & Adams, 1997). Eine Erhöhung des Redox-Potentials von -620 mV auf -590 mV wurde für eine C42D-Mutante von Ferredoxin aus *A. vinelandii* beobachtet (Jung *et al.*, 2000). Bereits geringe Änderungen im Aufbau des Clusters ergaben somit häufig ein deutlich verändertes Redox-Potential. Aufgrund des unterschiedlichen Reduktionszustandes von Pchlide und Chlide wird möglicherweise ein unterschiedliches Liganden-Muster für das spezifische Redox-Potential der [4Fe-4S]-Cluster von (BchY/BchZ)₂ oder (BchN/BchB)₂ benötigt.

3.9 Der enzymatische Mechanismus der COR

Mit Hilfe der in dieser Arbeit erhaltenen biochemischen und biophysikalischen Ergebnisse wurde ein möglicher Reaktionsmechanismus für die COR postuliert (Abbildung 29).

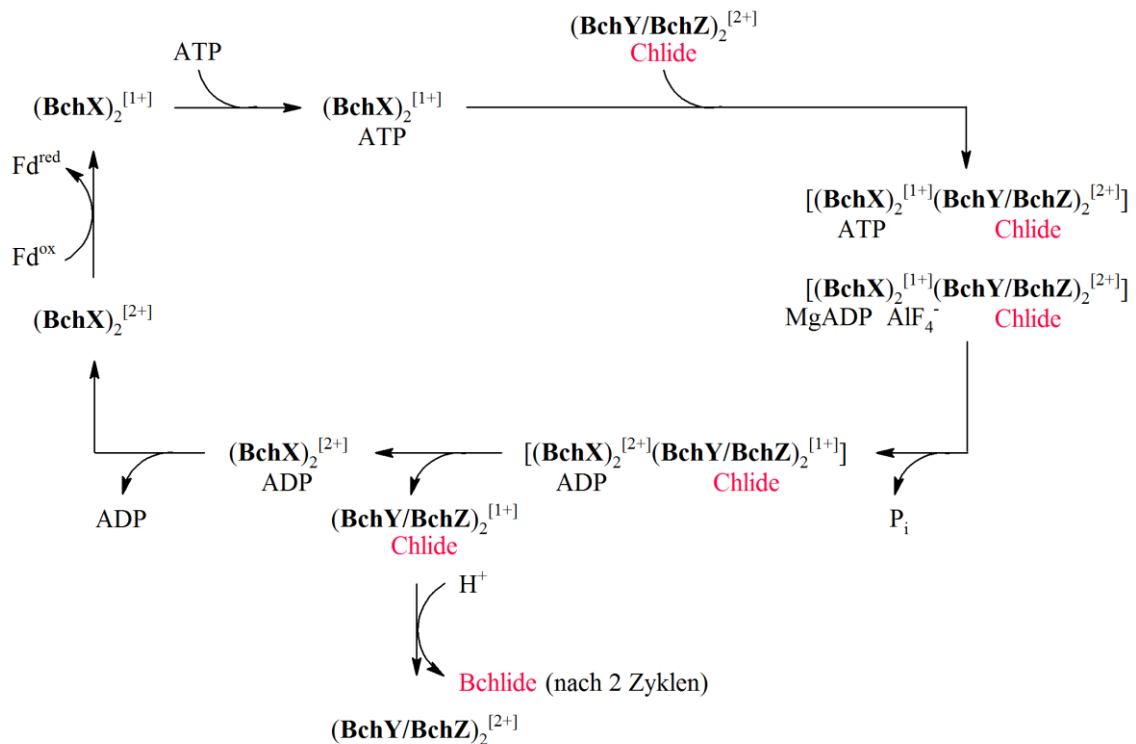


Abbildung 29: Postulierter Reaktionsmechanismus der COR-Katalyse.

Das schematische Modell zeigt die dynamische Interaktion der COR-Untereinheiten und die Übertragung der Elektronen während der ATP-abhängigen Katalyse. Für die vollständige 2 e⁻-Reduktion des Chlide muss der Zyklus zweimal durchlaufen werden.

Der [4Fe-4S]-Cluster des (BchX)₂-Homodimers wird vermutlich durch ein Ferredoxin reduziert. Sowohl für die homologe DPOR als auch die Nitrogenase wurde eine initiale Reduktion durch ein Ferredoxin beobachtet (Mortenson, 1964; Nomata *et al.*, 2005). Danach können zwei ATP-Moleküle pro (BchX)₂-Molekül binden. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass das Nukleotid-abhängige „Switch“-Protein (BchX)₂ einen ternären Komplex mit dem substratgebundenen katalytischen (BchY/BchZ)₂-Komplex ausbildet. Dieser transiente (BchX)₂(BchY/BchZ)₂(BchX)₂-Komplex wurde in der vorliegenden Arbeit in Anwesenheit des ATP-Analogons MgADP·AlF₄⁻ stabilisiert. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das verwendete ATP-Analogon den Übergangszustand der ATP-Hydrolyse initiiert (Moser *et al.*, 2013; Schindelin *et al.*, 1997).

Der transiente COR-Komplex ermöglicht die Übertragung eines einzelnen Elektrons vom [4Fe-4S]-Cluster des (BchX)₂-Proteins auf den [4Fe-4S]-Cluster des katalytischen (BchY/BchZ)₂-Subkomplexes. Der reduzierte (BchY/BchZ)₂-Cluster ist nun in der Lage,

das Substrat Chlide zu reduzieren. Insgesamt sind für die Reduktion des Substrates zwei Elektronen notwendig, sodass der vorgeschlagene Zyklus insgesamt zweimal durchlaufen wird. Nach der Hydrolyse kommt es zur Dissoziation des ternären Komplexes.

Die Bildung von Bchl_a erfordert weiterhin die stereo- und regio-spezifische Addition von zwei Protonen. Aufgrund von Sequenzvergleichen (Anhang 3) wurde vermutet, dass die COR einen von der DPOR abweichenden Protonierungsmechanismus nutzt. Weder die Aminosäure Asp-290 noch das His-394 des ChlB der DPOR haben eine Entsprechung in der Sequenz von BchZ (*P. marinus* Nummerierung; Moser *et al.*, 2013).

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der Bakteriochlorophyll *a* Biosynthese wird die stereo- und regiospezifische Reduktion der C-7/C-8-Doppelbindung von Chlorophyllid *a* durch die Chlorophyllid *a* Oxidoreduktase (COR) katalysiert. Die drei COR-Untereinheiten BchX, BchY und BchZ besitzen eine deutliche Aminosäure-Sequenzhomologie zu den entsprechenden Untereinheiten der Nitrogenase und zu den Untereinheiten der Licht-unabhängigen Protochlorophyllid *a* Oxidoreduktase (DPOR). Die DPOR katalysiert die Reduktion der C-17/C-18-Doppelbindung von Protochlorophyllid *a*. Chlorophyllid *a* wird durch die Übertragung von zwei Elektronen über zwei Redox-aktive [Fe-S]-Cluster reduziert.

Mit Hilfe von Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie wurde für (BchX)₂ ein [4Fe-4S]-Cluster nachgewiesen. Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie konnte die heterotetramere Struktur von (BchY/BchZ)₂ gezeigt werden. Mittels EPR-Spektroskopie konnten für (BchY/BchZ)₂ zwei [4Fe-4S]-Cluster nachgewiesen werden.

Durch ortsgerichtete Mutagenese-Experimente in Kombination mit Aktivitätstestuntersuchungen und EPR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass der [4Fe-4S]-Cluster von (BchY/BchZ)₂ durch vier Cystein-Liganden koordiniert wird. Somit unterscheidet sich die COR von der homologen DPOR, welche drei Cystein- und einen Aspartat-Liganden für die Ausbildung eines [4Fe-4S]-Clusters besitzt. In weiteren Mutageneseexperimenten wurde das Liganden-Muster der DPOR auf (BchY/BchZ)₂ übertragen. Die entsprechende COR-Doppelmutante zeigte zwar keinerlei enzymatische Aktivität, mittels EPR konnte jedoch die Ausbildung eines artifiziellen [4Fe-4S]-Clusters in Gegenwart eines Aspartat-Liganden nachgewiesen werden. Das unterschiedliche Liganden-Muster der DPOR und der COR ist möglicherweise verantwortlich für das spezifische Redox-Potential der entsprechenden Redox-aktiven [4Fe-4S]-Cluster.

In der vorliegenden Arbeit wurde der ternäre COR-Enzymkomplex, (BchX)₂(BchY/BchZ)₂(BchX)₂, in Anwesenheit des ATP-Analogons, MgADP·AlF₄⁻ detektiert. MgADP·AlF₄⁻ ist in der Lage den Übergangszustand der ATP-Hydrolyse nachzuahmen. Somit besitzt die COR vermutlich einen ähnlichen katalytischen Reaktionsmechanismus wie die DPOR. Dabei werden vermutlich unter ATP-Verbrauch

die Elektronen über den [4Fe-4S]-Cluster der (BchX)₂-Untereinheit über den [4Fe-4S]-Cluster der (BchY/BchZ)₂-Untereinheit auf das Substrat übertragen. (BchX)₂ nutzt dabei möglicherweise einen Nukleotid-abhängigen „Switch“-Mechanismus für die transiente Ausbildung des ternären Proteinkomplexes.

5 Summary

During Bacteriochlorophyll *a* biosynthesis the stereo- and regiospecific reduction of the C-7/C-8 double bond of chlorophyllide *a* is catalyzed by the chlorophyllide *a* oxidoreductase (COR). The three COR subunits BchX, BchY and BchZ share a high degree of amino acid sequence homology to nitrogenase and to light-independent protochlorophyllide *a* oxidoreductase (DPOR). DPOR catalyzes the reduction of the C-17/C-18 double bond of protochlorophyllide *a*. Chlorophyllide *a* is reduced by the transfer of two electrons *via* the redox-active iron-sulfur-clusters of COR.

Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) revealed a [4Fe-4S] cluster for the (BchX)₂ homodimer. Gel permeation chromatography experiments indicated the heterotetrameric structure of the (BchY/BchZ)₂ subcomplex. EPR spectroscopy revealed two [4Fe-4S] clusters on the (BchY/BchZ)₂ subunit.

Site-directed mutagenesis experiments in combination with a coupled *in vitro* activity assay and EPR spectroscopy indicated that the [4Fe-4S]-cluster of (BchY/BchZ)₂ is coordinated by four cysteine ligands. Therefore, COR differs from closely related DPOR, in which the cluster is ligated by three cysteins and one aspartate. In following mutagenesis experiments a DPOR-like ligation pattern was implemented for (BchY/BchZ)₂. The appropriate COR double mutant did not show any enzymatic activity, but EPR revealed an artificial [4Fe-4S] cluster. The different ligation pattern of DPOR and COR might be responsible for the specific redox potential of the [4Fe-4S] clusters in the respective enzyme-complexes.

In this study the ternary COR complex, (BchX)₂(BchY/BchZ)₂(BchX)₂, was detected in the presence of the ATP analog MgADP·AlF₄⁻ resembling the transition state of ATP hydrolysis. Therefore, a COR reaction mechanism in analogy to the catalytic reaction mechanism of DPOR was proposed. Individual electrons are transferred *via* the [4Fe-4S] cluster of (BchX)₂ onto the [4Fe-4S] cluster of (BchY/BchZ)₂ on the substrate. A nucleotide-dependent switch mechanism of (BchX)₂ was proposed.

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen die Interaktion der beiden COR-Subkomplexe und das Vorhandensein von [4Fe-4S]-Clustern in der (BchX)₂- und (BchY/BchZ)₂-Untereinheit. Darüber hinaus bleiben Fragen zum exakten Reaktionsmechanismus der COR und den Redox-Potentialen der Cluster offen. Folgende weiterführende Untersuchungen sollten durchgeführt werden:

- Ko-Kristallisationsexperimente für den oktameren Komplex (BchX)₂(BchY/BchZ)₂(BchX)₂
- Bestimmung der Redox-Potentiale der [4Fe-4S]-Cluster
- Chimäre Aktivitätstests unter Verwendung von (BchY/BchZ)₂
- Identifikation der Protonendonoren der COR-Katalyse durch Mutagenese-Experimente
- Untersuchung der kinetischen Parameter der COR

7 Literaturverzeichnis

- Aaij, C. and Borst, P. (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **269**(2): 192–200.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**(3): 403–410.
- Arber, W. and Linn, S. (1969) DNA modification and restriction. *Annu. Rev. Biochem.* **38**: 467–500.
- Bak, D. W. and Elliott, S. J. (2014) Alternative FeS cluster ligands: tuning redox potentials and chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**(0): 50–58.
- Baltes, W. (2004) Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen, 3rd ed. Behr Verl., Hamburg.
- Battersby, A. R. (2000) Tetrapyrroles: the pigments of life. *Nat. Prod. Rep.* **17**(6): 507–526.
- Bauer, J. C., Wright, D. A., Braman, J. C. and Geha, R. S. (1998) Dna molecules, digestion, mutagenic primers and annealing. US5789166 A.
- Beale, S. (1999) Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosyn. Res.* **60**(1): 43–73.
- Beale, S. I. and Castelfranco, P. A. (1973) ^{14}C incorporation from exogenous compounds into δ -aminolevulinic acid by greening *cucumber cotyledons*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**(1): 143–149.
- Berg, J. M., Stryer, L. and Tymoczko, J. L. (2007) Biochemie, 6th ed. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.].
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**(3): 293–300.
- Biel, A. J. and Marrs, B. L. (1983) Transcriptional regulation of several genes for bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsulata* in response to oxygen. *J. Bacteriol.* **156**(2): 686–694.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6): 1513–1523.
- Blankenship, R. E. (1992) Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosyn. Res.* **33**: 91–111.
- Blankenship, R. E. (2010) Early evolution of photosynthesis. *Plant Physiol.* **154**(2): 434–438.
- Blankenship, R. E. (2014) Molecular mechanisms of photosynthesis, 2nd ed. Wiley Blackwell, Chichester.
- Bollivar, D. W., Suzuki, J. Y., Beatty, J. T., Dobrowolski, J. M. and Bauer, C. E. (1994) Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Biol.* **237**(5): 622–640.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Bröcker, M. J., Schomburg, S., Heinz, D. W., Jahn, D., Schubert, W.-D. and Moser, J. (2010a) Crystal structure of the nitrogenase-like dark operative protochlorophyllide

- oxidoreductase catalytic complex (ChlN/ChlB)₂. J. Biol. Chem. **285**(35): 27336–27345.
- Bröcker, M. J., Virus, S., Ganskow, S., Heathcote, P., Heinz, D. W., Schubert, W.-D., Jahn, D. and Moser, J. (2008a) ATP-driven reduction by dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase from *Chlorobium tepidum* mechanistically resembles nitrogenase catalysis. J. Biol. Chem. **283**(16): 10559–10567.
- Bröcker, M. J., Wätzlich, D., Saggu, M., Lenzian, F., Moser, J. and Jahn, D. (2010b) Biosynthesis of (bacterio)chlorophylls: ATP-dependent transient subunit interaction and electron transfer of dark operative protochlorophyllide oxidoreductase. J. Biol. Chem. **285**(11): 8268–8277.
- Bröcker, M. J., Wätzlich, D., Uliczka, F., Virus, S., Saggu, M., Lenzian, F., Scheer, H., Rüdiger, W., Moser, J. and Jahn, D. (2008b) Substrate recognition of nitrogenase-like dark operative protochlorophyllide oxidoreductase from *Prochlorococcus marinus*. J. Biol. Chem. **283**(44): 29873–29881.
- Brookman, J. S. (1975) Further studies on the mechanism of cell disruption by extreme pressure extrusion. Biotechnol. Bioeng. **17**(4): 465–479.
- Buchanan, B. B. (1992) Carbon dioxide assimilation in oxygenic and anoxygenic photosynthesis. Photosyn. Res. **33**(2): 147–162.
- Burgess, B. K. and Lowe, D. J. (1996) Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. Chem. Rev. **96**(7): 2983–3012.
- Burke, D. H., Alberti, M. and Hearst, J. E. (1993a) The *Rhodobacter capsulatus* chlorin reductase-encoding locus, *bchA*, consists of three genes, *bchX*, *bchY*, and *bchZ*. J. Bacteriol. **175**(8): 2407–2413.
- Burke, D. H., Hearst, J. E. and Sidow, A. (1993b) Early evolution of photosynthesis: clues from nitrogenase and chlorophyll iron proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**(15): 7134–7138.
- Chan, M. K., Kim, J. and Rees, D. C. (1993) The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. Science **260**(5109): 792–794.
- Chen, M. (2014) Chlorophyll modifications and their spectral extension in oxygenic photosynthesis. Annu. Rev. Biochem. **83**: 317–340.
- Chew, A. G. M. and Bryant, D. A. (2007) Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity. Annu. Rev. Microbiol. **61**: 113–129.
- Chisti, Y. and Moo-Young, M. (1986) Disruption of microbial cells for intracellular products. Enzyme Microb. Technol. **8**(4): 194–204.
- Christiansen, J., Goodwin, P. J., Lanzilotta, W. N., Seefeldt, L. C. and Dean, D. R. (1998) Catalytic and biophysical properties of a nitrogenase Apo-MoFe protein produced by a *nifB*-deletion mutant of *Azotobacter vinelandii*. Biochemistry **37**(36): 12611–12623.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **69**(8): 2110–2114.
- Combet, C. (2000) NPS@: Network Protein Sequence Analysis. Trends Biochem. Sci. **25**(3): 147–150.
- Conover, R. C., Kowal, A. T., Fu, W. G., Park, J. B., Aono, S., Adams, M. W. and Johnson, M. K. (1990) Spectroscopic characterization of the novel iron-sulfur cluster in *Pyrococcus furiosus* ferredoxin. J. Biol. Chem. **265**(15): 8533–8541.

- Corley, R. B. (2004) A guide to methods in the biomedical sciences. Springer, New York.
- Czarnecki, O. and Grimm, B. (2012) Post-translational control of tetrapyrrole biosynthesis in plants, algae, and cyanobacteria. *J. Exp. Bot.* **63**(4): 1675–1687.
- Dammeyer, T. and Frankenberg-Dinkel, N. (2008) Function and distribution of bilin biosynthesis enzymes in photosynthetic organisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**(10): 1121–1130.
- Dannheim, H. (2011) Heterologe Produktion und Reinigung des (BchY/BchZ)₂-Komplexes der Chlorophyllid *a* Oxidoreduktase aus *Roseobacter denitrificans* Bachelorarbeit. Technische Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie, Braunschweig.
- Duin, E. C., Lafferty, M. E., Crouse, B. R., Allen, R. M., Sanyal, I., Flint, D. H. and Johnson, M. K. (1997) [2Fe-2S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry* **36**(39): 11811–11820.
- Eckert, W. A. and Kartenbeck, J. (1997) Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion. Springer Labormanual. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Edman, P., Högfeldt, E., Sillén, L. G. and Kinell, P.-O. (1950) Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chem. Scand.* **4**: 283–293.
- Einsle, O., Tezcan, F. A., Andrade, S. L. A., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J. B. and Rees, D. C. (2002) Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. *Science* **297**(5587): 1696–1700.
- Engler, C., Kandzia, R. and Marillonnet, S. (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS ONE* **3**(11): e3647.
- Flühe, L., Knappe, T. A., Gattner, M. J., Schäfer, A., Burghaus, O., Linne, U. and Marahiel, M. A. (2012) The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A. *Nat. Chem. Biol.* **8**(4): 350–357.
- Fuchs, G., Schlegel, H. G. and Eitinger, T. (2007) Allgemeine Mikrobiologie 53 Tabellen, 8th ed. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Fujita, Y. (1996) Protochlorophyllide reduction: a key step in the greening of plants. *Plant Cell Physiol.* **37**(4): 411–421.
- Fujita, Y. and Bauer, C. E. (2000) Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits. In vitro confirmation of nitrogenase-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**(31): 23583–23588.
- Fujita, Y. and Bauer, C. E. (2003) 80 - The Light-Independent Protochlorophyllide Reductase: A Nitrogenase-Like Enzyme Catalyzing a Key Reaction for Greening in the Dark, p 109–156. In Guillard, Karl M. KadishKevin M. SmithRoger (ed), *The Porphyrin Handbook*. Academic Press, Amsterdam.
- Ganskow, S. (2006) Heterologe Expression und Charakterisierung der lichtunabhängigen Protochlorophyllid Oxidoreduktase aus *Chlorobium tepidum*. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie, Braunschweig.
- GE Healthcare Bio-Science AB (2009) Recombinant Protein Purification Handbook Principles and Methods. GE Healthcare Bio-Science AB.
- Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J. and Rees, D. C. (1992) Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* **257**(5077): 1653–1659.

- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J. and Lopez, R. (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **38**(Web Server issue): W695-9.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. and Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**(12): 4645–4649.
- Grimm, B. (2006) Chlorophylls and bacteriochlorophylls Biochemistry, biophysics, functions and applications. *Advances in photosynthesis and respiration*, vol 25. Springer, Dordrecht.
- Guigliarelli, B. and Bertrand, P. (1999) Application of EPR Spectroscopy to the Structural and Functional Study of Iron-Sulfur Proteins. *Adv. Inorg. Chem.* **47**: 421–497.
- Gupta, R. S., Mukhtar, T. and Singh, B. (1999) Evolutionary relationships among photosynthetic prokaryotes (*Helio bacterium chlorum*, *Chloroflexus aurantiacus*, cyanobacteria, *Chlorobium tepidum* and proteobacteria): implications regarding the origin of photosynthesis. *Mol. Microbiol.* **32**(5): 893–906.
- Hagen, W. R., Eady, R. R., Dunham, W. R. and Haaker, H. (1985) A novel $S = 3/2$ EPR signal associated with native Fe-proteins of nitrogenase. *FEBS Lett.* **189**(2): 250–254.
- Hänzelmann, P., Hernández, H. L., Menzel, C., García-Serres, R., Huynh, B. H., Johnson, M. K., Mendel, R. R. and Schindelin, H. (2004) Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**(33): 34721–34732.
- Harada, J., Mizoguchi, T., Tsukatani, Y., Yokono, M., Tanaka, A. and Tamiaki, H. (2014) Chlorophyllide *a* oxidoreductase works as one of the divinyl reductases specifically involved in bacteriochlorophyll *a* biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **289**(18): 12716–12726.
- Heyes, D. and Hunter, N. C. (2009) Biosynthesis of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll, p 235–249. *In* Tetrapyrroles. Molecular Biology Intelligence Unit. Springer New York.
- Heyes, D. J. and Hunter, C. N. (2005) Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase. *Trends Biochem. Sci.* **30**(11): 642–649.
- Heyes, D. J., Ruban, A. V., Wilks, H. M. and Hunter, C. N. (2002) Enzymology below 200 K: the kinetics and thermodynamics of the photochemistry catalyzed by protochlorophyllide oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**(17): 11145–11150.
- Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D. R. and Seefeldt, L. C. (2014) Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chem. Rev.* **114**(8): 4041–4062.
- Hollingshead, S., Kopecká, J., Jackson, P. J., Canniffe, D. P., Davison, P. A., Dickman, M. J., Sobotka, R. and Hunter, C. N. (2012) Conserved chloroplast open-reading frame ycf54 is required for activity of the magnesium protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase in *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **287**(33): 27823–27833.
- Hu, Y. and Ribbe, M. W. (2011) Biosynthesis of nitrogenase FeMoco. *Coord. Chem. Rev.* **255**(9–10): 1218–1224.

- Hu, Y. and Ribbe, M. W. (2015) Nitrogenase and homologs. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**(2): 435–445.
- Huberman, A. and Pérez, C. (2002) Nonheme iron determination. *Anal. Biochem.* **307**(2): 375–378.
- Hunter, C. N. and Coomber, S. A. (1988) Cloning and Oxygen-regulated Expression of the Bacteriochlorophyll Biosynthesis Genes *bch E, B, A* and *C* of *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **134**(6): 1491–1497.
- Jaganaman, S., Pinto, A., Tarasev, M. and Ballou, D. P. (2007) High levels of expression of the iron-sulfur proteins phthalate dioxygenase and phthalate dioxygenase reductase in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **52**(2): 273–279.
- Jahn, D. and Heinz, D. W. (2009) Biosynthesis of 5-Aminolevulinic Acid, p 29–42. *In* Warren MJ, Smith AG (ed), Tetrapyrroles. Springer New York, New York, NY.
- Jang, S. B., Seefeldt, L. C. and Peters, J. W. (2000) Insights into Nucleotide Signal Transduction in Nitrogenase: Structure of an Iron Protein with MgADP Bound †,‡. *Biochemistry* **39**(48): 14745–14752.
- Jerpseth, M., Jerpseth, B., Briester, L. and Greener, A. (1998). Strategies **11** (1): 3–4.
- Jung, Y. S., Bonagura, C. A., Tilley, G. J., Gao-Sheridan, H. S., Armstrong, F. A., Stout, C. D. and Burgess, B. K. (2000) Structure of C42D *Azotobacter vinelandii* FdI. A Cys-X-X-Asp-X-X-Cys motif ligates an air-stable $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ cluster. *J. Biol. Chem.* **275**(47): 36974–36983.
- Kiang, N. Y., Siefert, J., Govindjee and Blankenship, R. E. (2007) Spectral signatures of photosynthesis. I. Review of Earth organisms. *Astrobiology* **7**(1): 222–251.
- Kim, E.-J., Kim, J.-S., Lee, I.-H., Rhee, H. J. and Lee, J. K. (2008) Superoxide generation by chlorophyllide *a* reductase of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* **283**(7): 3718–3730.
- Kim, E.-J., Kim, J.-S., Rhee, H. J. and Lee, J. K. (2009) Growth arrest of *Synechocystis* sp. 5PCC68036 by superoxide generated from heterologously expressed *Rhodobacter sphaeroides* chlorophyllide *a* reductase. *FEBS Lett.* **583**(1): 219–223.
- Kim, J. and Rees, D. C. (1992) Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Nature* **360**(6404): 553–560.
- Kondo, T., Nomata, J., Fujita, Y. and Itoh, S. (2011) EPR study of 1Asp-3Cys ligated 4Fe-4S iron-sulfur cluster in NB-protein (BchN-BchB) of a dark-operative protochlorophyllide reductase complex. *FEBS Lett.* **585**(1): 214–218.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680–685.
- Lancaster, K. M., Hu, Y., Bergmann, U., Ribbe, M. W. and DeBeer, S. (2013) X-ray spectroscopic observation of an interstitial carbide in NifEN-bound FeMoco precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **135**(2): 610–612.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**(21): 2947–2948.
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. and McCoy, J. M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N.Y.)* **11**(2): 187–193.

- Lindahl, P. A., Day, E. P., Kent, T. A., Orme-Johnson, W. H. and Münck, E. (1985) Mössbauer, EPR, and magnetization studies of the *Azotobacter vinelandii* Fe protein. Evidence for a $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ cluster with spin $S = 3/2$. J. Biol. Chem. **260**(20): 11160–11173.
- Liu, Z. and Bryant, D. A. (2011) Multiple types of 8-vinyl reductases for (bacterio)chlorophyll biosynthesis occur in many green sulfur bacteria. J. Bacteriol. **193**(18): 4996–4998.
- Lottspeich, F. and Engels, J. W. (2006) Bioanalytik, 2nd ed. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg.
- Mäntele, W. (2012) Biophysik. UTB, 3270 : Biophysik, Chemie, Biologie, Medizin. UTB, Stuttgart.
- Margulis, L. and Chapman, M. J. (1998) Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution. Trends Microbiol. **6**(9): 342–345.
- May, H. D., Dean, D. R. and Newton, W. E. (1991) Altered nitrogenase MoFe proteins from *Azotobacter vinelandii*. Analysis of MoFe proteins having amino acid substitutions for the conserved cysteine residues within the beta-subunit. Biochem. J. **277** (Pt 2): 457–464.
- McFeeters, R. F., Chichester, C. O. and Whitaker, J. R. (1971) Purification and Properties of Chlorophyllase from *Ailanthus altissima* (Tree-of-Heaven). Plant Physiol. **47**(5): 609–618.
- McGlynn, P. and Hunter, N. C. (1993) Genetic analysis of the *bchC* and *bchA* genes of *Rhodobacter sphaeroides*. Mol. Gen. Genet. **236**(2-3): 227–234.
- Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Huang, C. C. and Ferrin, T. E. (2006) Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. BMC Bioinformatics **7**: 339.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, A. G., Tanaka, A. and Terry, M. J. (2010) The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. Trends Plant Sci. **15**(9): 488–498.
- Monod, J. (1949) The Growth of Bacterial Cultures. Annu. Rev. Microbiol. **3**(1): 371–394.
- Mortenson, L. E. (1964) Ferredoxin and ATP, Requirements for Nitrogen Fixation in Cell-free Extracts of *Clostridium pasteurianum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **52**: 272–279.
- Moser, J. and Bröcker, M. J. (2011) Enzymatic Systems with Homology to Nitrogenase, p 67–77. In Ribbe MW (ed), Nitrogen Fixation. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York City.
- Moser, J., Lange, C., Krausze, J., Rebele, J., Schubert, W.-D., Ribbe, M. W., Heinz, D. W. and Jahn, D. (2013) Structure of ADP-aluminium fluoride-stabilized protochlorophyllide oxidoreductase complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **110**(6): 2094–2098.
- Mouesca, J.-M. and Lamotte, B. (1998) Iron–sulfur clusters and their electronic and magnetic properties. Coord. Chem. Rev. **178-180**: 1573–1614.
- Mülhardt, C. (2009) Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. Experimentator, 6th ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Müller, A. H., Gough, S. P., Bollivar, D. W., Meldal, M., Willows, R. D. and Hansson, M. (2011) Methods for the preparation of chlorophyllide *a*: an intermediate of the chlorophyll biosynthetic pathway. *Anal. Biochem.* **419**(2): 271–276.
- Munk, K. (2008) *Biochemie Zellbiologie*, 1st ed. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G. and Fujita, Y. (2010) X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature* **465**(7294): 110–114.
- Murat, D., Byrne, M. and Komeili, A. (2010) Cell biology of prokaryotic organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**(10): a000422.
- Nakamura, M., Saeki, K. and Takahashi, Y. (1999) Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hs cA-fdx*-ORF3 gene cluster. *J. Biochem.* **126**(1): 10–18.
- Nelson, N. and Junge, W. (2015) Structure and Energy Transfer in Photosystems of Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.*(84): 659–683.
- Nomata, J., Kitashima, M., Inoue, K. and Fujita, Y. (2006a) Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *FEBS Lett.* **580**(26): 6151–6154.
- Nomata, J., Kondo, T., Itoh, S. and Fujita, Y. (2013) Nicotinamide is a specific inhibitor of dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase, a nitrogenase-like enzyme, from *Rhodobacter capsulatus*. *FEBS Lett.* **587**(18): 3142–3147.
- Nomata, J., Kondo, T., Mizoguchi, T., Tamiaki, H., Itoh, S. and Fujita, Y. (2014) Dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase generates substrate radicals by an iron-sulphur cluster in bacteriochlorophyll biosynthesis. *Sci. Rep.* **4**: 5455.
- Nomata, J., Mizoguchi, T., Tamiaki, H. and Fujita, Y. (2006b) A second nitrogenase-like enzyme for bacteriochlorophyll biosynthesis: reconstitution of chlorophyllide *a* reductase with purified X-protein (BchX) and YZ-protein (BchY-BchZ) from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* **281**(21): 15021–15028.
- Nomata, J., Ogawa, T., Kitashima, M., Inoue, K. and Fujita, Y. (2008) NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters. *FEBS Lett.* **582**(9): 1346–1350.
- Nomata, J., Swem, L. R., Bauer, C. E. and Fujita, Y. (2005) Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1708**(2): 229–237.
- Novagen (2011) Duet Vectors User Protocol TB340 Rev. F 0211JN. EMD Chemicals Inc., Darmstadt.
- Onate, Y. A., Finnegan, M. G., Hales, B. J. and Johnson, M. K. (1993) Variable temperature magnetic circular dichroism studies of reduced nitrogenase iron proteins and [4Fe-4S]⁺ synthetic analog clusters. *Biochim. Biophys. Acta* **1164**(2): 113–123.
- Perry, R. D. and San Clemente, C. L. (1977) Determination of iron with bathophenanthroline following an improved procedure for reduction of iron(III) ions. *Analyst* **102**(1211): 114.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**(13): 1605–1612.

- Porath, J. and Olin, B. (1983) Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* **22**(7): 1621–1630.
- Pudek, M. R. and Richards, W. R. (1975) Possible alternate pathway of bacteriochlorophyll biosynthesis in a mutant of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochemistry* **14**(14): 3132–3137.
- Raymond, J. (2008) Coloring in the tree of life. *Trends Microbiol.* **16**(2): 41–43.
- Raymond, J. and Blankenship, R. E. (2008) The origin of the oxygen-evolving complex. *Coord. Chem. Rev.* **252**(3–4): 377–383.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R. and Blankenship, R. E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* **21**(3): 541–554.
- Reineke, A. (2004) *Gentechnik: Grundlagen, Methoden und Anwendungen*. UTB GmbH, Stuttgart.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**(12): 5463–5467.
- Sarma, R., Barney, B. M., Hamilton, T. L., Jones, A., Seefeldt, L. C. and Peters, J. W. (2008) Crystal structure of the L protein of *Rhodobacter sphaeroides* light-independent protochlorophyllide reductase with MgADP bound: a homologue of the nitrogenase Fe protein. *Biochemistry* **47**(49): 13004–13015.
- Saunders, A. H., Golbeck, J. H. and Bryant, D. A. (2013) Characterization of BciB: a ferredoxin-dependent 8-vinyl-protochlorophyllide reductase from the green sulfur bacterium *Chloroherpeton thalassium*. *Biochemistry* **52**(47): 8442–8451.
- Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J. L., Howard, J. B. and Rees, D. C. (1997) Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature* **387**(6631): 370–376.
- Schlicke, H., Richter, A., Rothbart, M., Brzezowski, P., Hedtke, B. and Grimm, B. (2015) Function of Tetrapyrroles, Regulation of Tetrapyrrole Metabolism and Methods for Analyses of Tetrapyrroles. *Procedia Chem.* **14**(0): 171–175.
- Schlögl, R. (2003) Katalytische Ammoniaksynthese – eine “unendliche Geschichte”? *Angewandte Chemie* **115**(18): 2050–2055.
- Shemin, D. and Russell, C. S. (1953) δ -Aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines 1. *J. Am. Chem. Soc.* **75**(19): 4873–4874.
- Shen, G., Balasubramanian, R., Wang, T., Wu, Y., Hoffart, L. M., Krebs, C., Bryant, D. A. and Golbeck, J. H. (2007) SufR coordinates two $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, $^{1+}$ clusters and functions as a transcriptional repressor of the sufBCDS operon and an autoregulator of sufR in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* **282**(44): 31909–31919.
- Shepard, E. M., Boyd, E. S., Broderick, J. B. and Peters, J. W. (2011) Biosynthesis of complex iron–sulfur enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**(2): 319–327.
- Silverstein, A., Silverstein, V. B. and Nunn, L. S. (2008) *Photosynthesis. Science concepts, second series*. Twenty-First Century Books, Minneapolis.
- Slemmon, J. R., Salvaterra, P. M. and Saito, K. (1980) Preparation and characterization of peroxidase: antiperoxidase-Fab complex. *J. Histochem. Cytochem.* **28**(1): 10–15.
- Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**(1): 31–40.

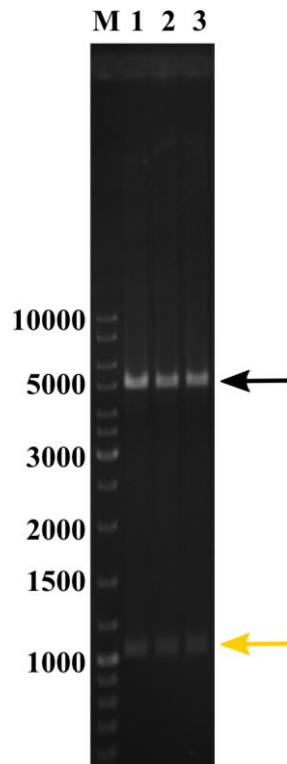
- Spatzal, T., Aksoyoglu, M., Zhang, L., Andrade, Susana L A, Schleicher, E., Weber, S., Rees, D. C. and Einsle, O. (2011) Evidence for interstitial carbon in nitrogenase FeMo cofactor. *Science* **334**(6058): 940.
- Staples, C. R., Lahiri, S., Raymond, J., Herbulis, L. von, Mukhopadhyay, B. and Blankenship, R. E. (2007) Expression and association of group IV nitrogenase NifD and NifH homologs in the non-nitrogen-fixing archaeon *Methanocaldococcus jannaschii*. *J. Bacteriol.* **189**(20): 7392–7398.
- Stoll, S. and Schweiger, A. (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **178**(1): 42–55.
- Strauss, G. and Fuchs, G. (1993) Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. *Eur. J. Biochem.* **215**(3): 633–643.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**: 60–89.
- Suzuki, J. Y., Bollivar, D. W. and Bauer, C. E. (1997) Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **31**: 61–89.
- Swisher, R. H., Landt, M. L. and Reithel, F. J. (1977) The molecular weight of, and evidence for two types of subunits in, the molybdenum-iron protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *Biochem. J.* **163**(3): 427–432.
- Takahashi, Y. and Nakamura, M. (1999) Functional assignment of the ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **126**(5): 917–926.
- Tanaka, R. and Tanaka, A. (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 321–346.
- Tezcan, F. A., Kaiser, J. T., Mustafi, D., Walton, M. Y., Howard, J. B. and Rees, D. C. (2005) Nitrogenase complexes: multiple docking sites for a nucleotide switch protein. *Science* **309**(5739): 1377–1380.
- Tolia, N. H. and Joshua-Tor, L. (2006) Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nat. Methods* **3**(1): 55–64.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**(9): 4350–4354.
- Tsukatani, Y., Harada, J., Nomata, J., Yamamoto, H., Fujita, Y., Mizoguchi, T. and Tamiaki, H. (2015) *Rhodobacter sphaeroides* mutants overexpressing chlorophyllide *a* oxidoreductase of *Blastochloris viridis* elucidate functions of enzymes in late bacteriochlorophyll biosynthetic pathways. *Sci. Rep.* **5**: 9741.
- Tsukatani, Y., Yamamoto, H., Harada, J., Yoshitomi, T., Nomata, J., Kasahara, M., Mizoguchi, T., Fujita, Y. and Tamiaki, H. (2013) An unexpectedly branched biosynthetic pathway for bacteriochlorophyll *b* capable of absorbing near-infrared light. *Sci. Rep.* **3**: 1217.
- Uchiyama, I., Mihara, M., Nishide, H. and Chiba, H. (2015) MBGD update 2015: microbial genome database for flexible ortholog analysis utilizing a diverse set of genomic data. *Nucleic Acids Res.* **43**(Database issue): D270–6.
- Van Die, I. M., Bergmans, H. E. and Hoekstra, W. P. (1983) Transformation in *Escherichia coli*: studies on the role of the heat shock in induction of competence. *J. Gen. Microbiol.* **129**(3): 663–670.

-
- Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. and Beck-Sickinger, A. G. (2002) Lehrbuch der Biochemie. Wiley-VCH, Weinheim.
- Walker, J. M. and Rapley, R. (2008) Molecular biomethods handbook, 2nd ed. Humana Press, Totowa, NJ.
- Wang, P., Wan, C., Xu, Z., Wang, P., Wang, W., Sun, C., Ma, X., Xiao, Y., Zhu, J., Gao, X. and Deng, X. (2013) One divinyl reductase reduces the 8-vinyl groups in various intermediates of chlorophyll biosynthesis in a given higher plant species, but the isozyme differs between species. *Plant Physiol.* **161**(1): 521–534.
- Wätzlich, D. (2009) Nitrogenase-Like Enzymes of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll Biosynthesis Dissertation. Technische Universität Braunschweig, Institut für Mikrobiologie, Braunschweig.
- Wätzlich, D., Bröcker, M. J., Uliczka, F., Ribbe, M., Virus, S., Jahn, D. and Moser, J. (2009) Chimeric nitrogenase-like enzymes of (bacterio)chlorophyll biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **284**(23): 15530–15540.
- Weaver, P. F., Wall, J. D. and Gest, H. (1975) Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **105**(3): 207–216.
- Wiig, J. A., Lee, C.-C., Fay, A. W., Hu, Y. and Ribbe, M. W. (2011) Purification of nitrogenase proteins. *Methods Mol. Biol.* **766**: 93–103.
- Willows, R. D., Li, Y., Scheer, H. and Chen, M. (2013) Structure of chlorophyll *f*. *Org. Lett.* **15**(7): 1588–1590.
- Wu, D. Y. and Wallace, R. B. (1989) Specificity of the nick-closing activity of bacteriophage T4 DNA ligase. *Gene* **76**(2): 245–254.
- Xiong, J., Inoue, K. and Bauer, C. E. (1998) Tracking molecular evolution of photosynthesis by characterization of a major photosynthesis gene cluster from *Heliobacillus mobilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(25): 14851–14856.
- Yamamoto, H., Kato, M., Yamanashi, K. and Fujita, Y. (2014) Reconstitution of a sequential reaction of two nitrogenase-like enzymes in the bacteriochlorophyll biosynthetic pathway of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **448**(2): 200–205.
- Yang, Z. M. and Bauer, C. E. (1990) *Rhodobacter capsulatus* genes involved in early steps of the bacteriochlorophyll biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **172**(9): 5001–5010.
- Yang, Z.-Y., Danyal, K. and Seefeldt, L. (2011) Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase, p 9–29. *In* Ribbe MW (ed), Nitrogen Fixation. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York City.
- Yen, H. C. and Marrs, B. (1976) Map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* **126**(2): 619–629.
- Yin, L. and Bauer, C. E. (2013) Controlling the delicate balance of tetrapyrrole biosynthesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **368**(1622): 20120262.
- Yu, L., Vassiliev, I. R., Jung, Y. S., Bryant, D. A. and Golbeck, J. H. (1995) Modified ligands to FA and FB in photosystem I. II. Characterization of a mixed ligand [4Fe-4S] cluster in the C51D mutant of PsaC upon rebinding to P700-Fx cores. *J. Biol. Chem.* **270**(47): 28118–28125.
- Zhou, Z. H. and Adams, M. W. (1997) Site-directed mutations of the 4Fe-ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: role of the cluster-coordinating

aspartate in physiological electron transfer reactions. *Biochemistry* **36**(36): 10892–10900.

8 Anhang

8.1 Gewinnung des pGEX-*bchX* Vektors



Anhang 1: Agarose-Gelelektrophorese des Testverdaus von pGEX-*bchX*.

Agarose-Gelelektrophorese mit konstanter Spannung von 110 V für ~45 min (2.4.5) nach dem Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Xho*I für 1 h bei 37 °C (2.4.4). Danach Visualisierung der DNA mit Hilfe des interkalierenden Ethidiumbromids. **M**, 5 µL Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific), Angabe der Anzahl der Basenpaare (bp); **Spur 1-3**, Klon 1-3 aus dem Testverdau von pGEX-*bchX*. Die Klonierung des *bchX* Gens erfolgte aus dem Vektor pET-*bchX* (Wätzlich *et al.*, 2009) in die *Bam*HI/*Xho*-Restriktionsschnittstelle der MCS des pGEX-6P-1 (4960 bp, schwarzer Pfeil). Im resultierenden Vektor pGEX-*bchX* (Tabelle 5) erhielt BchX (1023 bp, gelber Pfeil) einen N-terminalen GST-Tag.

Anhang


113




Sequenz- und/oder Struktur-basiertes Alignment von BchY- und der ChlN-Untereinheit von *P. marinus* (Pm), BchN von *T. elongatus* (Te) und BchN von *R. capsulatus* (Rc). α -Helices (dunkelblau) und β -Faltblätter (hellblau) sind dargestellt. Die vorhergesagte Sekundärstruktur von *R. denitrificans* (Rd) BchY (SOPMA) ist hell- und dunkelblau schattiert. Die Sequenz-basierten Alignments wurden unter Verwendung von 13 BchY- (Kon 1), 15 BchlN/ChlN- (Kon 3) und BchY/BchN/ChlN- (Kon 2)-Sequenzen berechnet. Konservierte Reste und Reste mit ähnlichen Eigenschaften wurden markiert (Stern, Punkt und Doppelpunkt). Diese Sequenz-basierten Konservierungsmuster und das Struktur-basierte Alignment von BchN/ChlN wurden manuell zusammengefügt. Unterschiede in der strukturellen und primären Sequenz sind als (-) dargestellt. Wichtige Reste für die dynamische Protein-Protein-Interaktion von (BchN/BchB)₂/(ChlN/ChlB)₂ sind in Gelb gekennzeichnet. Liganden des [4Fe-4S]-Clusters in BchN/ChlN und mögliche Liganden für den [4Fe-4S]-Cluster in BchY sind rot oder rot schattiert hinterlegt (Moser *et al.*, 2013).

115


Kon 1	***. : ** *	***.***: * . : : : : * : : : : : *	
BchZ_Rd	367	FPG A AIRRHGTG---TP F MGYAGATYLLQEICNGL--FDALFHIL--P--L--GTDMD-----	
Kon 2		-----* . *	
ChlB_Pm	388	VISTPMH VQD VPA R YSPQM G WEGANVIFDDWV H PL...MMGLEEHL.. I GMF..RHDFE.....	
ChlB_Te	385	VIAAP T H I QD F PVGY R PFL G YEGTNQLVDLIYNSFTLGME.....DHL...LE I .FG C HDTKAV I HKCLGADSD L TWTAACLAB L NKIDCFVRCKVVRNTEKFA R E	
BchB_Rc	382	VISAPVH VQD FPARYAPQM G FEGANVLFDTWV H PL...VMGLEEHL.. L TMF.....	
Kon 3		* : . * * : : : * * . : : : : *	
Kon 1		. : * * : : : * : : ** . : m : * * + *	
BchZ_Rd	413	-----ATDATLT P LRRDFPWDE D AQAMLDRI V ETHPILTRIS A AKSLR--DAAEK A AALAAGDER V VLSTVRALD P ASAGPDLE D QT-----	
Kon 2		-----	
ChlB_Pm	440FTDGHQ S HL G HL C CHAGET K TSSKCGINQSP N NHSPAGE I HWT S EGESEL A KIP F FVRGK V RRNTEKYAR Q AGCREID G ETLLDAKA H	
ChlB_Te	492	GGIGDITVLVYAAKEAVG	
BchB_Rc		
Kon 3		* . * * : * * * * . : * : : * . : : : *	
Kon 1			
BchZ_Rd		-----	
Kon 2		-----	
ChlB_Pm	528	FG A	
ChlB_Te		
BchB_Rc	429	... REDDFFHDAGACHHGCKAVAREEDPVAPADLAPAATSDTPADGDVVVVTASGGEIRWMPEARERDLRKIPFVRCKAKRNTELVAAHKVODITVETLVBAKAVAR	
Kon 3		.	




 α-Helix



 β-Faltblatt



 vorhergesagte α-Helix




 vorgesagtes β-Faltblatt

A


 jeder zehnte Rest

I


 Reste beteiligt an der BchN/BchB- oder ChlN/ChlB-Interaktion




 strukturell ungeordnete Regionen



 [4Fe-4S]-Cluster-Liganden



 mögliche [4Fe-4S]-Cluster-Liganden



 Reste zur Stabilisierung des [4Fe-4S]-Clusters

.../-

 Insertionen

*

 konservierte Reste

.

 schwache, ähnliche Eigenschaften

:

 starke, ähnliche Eigenschaften

 Unterschiede im Struktur-basierten und primären Alignment

Kon 1

 primäres Alignment von BchZ

Kon 2

 primäres Alignment von BchZ und BchB/ChlB

Kon 3

 primäres Alignment von BchB/ChlB

Anhang 3 Sequenz- und/oder Struktur-basiertes Alignment von BchZ- und BchB/ChlB-Untereinheiten (siehe vorherige Seite).

Sequenz- und/oder Struktur-basiertes Alignment von BchZ- und der ChlB-Untereinheit von *P. marinus* (Pm), BchB von *T. elongatus* (Te) und BchB von *R. capsulatus* (Rc). α -Helices (dunkelblau) und β -Faltblätter (hellblau) sind dargestellt. Die vorhergesagte Sekundärstruktur von *R. denitrificans* (Rd) BchZ (SOPMA) ist hell- und dunkelblau schattiert. Die Sequenz-basierten Alignments wurden aus repräsentativen 13 BchZ- (Kon 1), 15 BchlB/ChlB- (Kon 3) und BchZ/BchB/ChlB- (Kon 2)-Sequenzen bestimmt. Konservierte Reste und Reste mit ähnlichen Eigenschaften wurden markiert (Stern, Punkt und Doppelpunkt). Diese Sequenz-basierten Konservierungsmuster und das Struktur-basierte Alignment von BchB/ChlB wurden manuell zusammengefügt. Unterschiede in der strukturellen und primären Sequenz sind als (-) dargestellt. Wichtige Reste für die dynamische Protein-Protein-Interaktion von (BchN/BchB)₂/(ChlN/ChlB)₂ sind in Gelb gekennzeichnet. Liganden des [4Fe-4S]-Clusters in BchB/ChlB und mögliche Liganden für den [4Fe-4S]-Cluster in BchZ sind rot oder rot schattiert hinterlegt. Stabilisierende Aminosäuren des [4Fe-4S]-Clusters in BchB/ChlB sind grün hinterlegt (Moser *et al.*, 2013).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in den letzten Jahren in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ralf R. Mendel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich danke auch Frau Prof. Dr. Susanne Engelmann für Ihr Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Jürgen Moser, der mir immer hilfreich zur Seite stand, mich herausragend betreut und immer motiviert hat.

Ein großes Dankeschön geht an die AG Moser. Simone Virus, Dr. Stefanie Hebecker, Dr. Wiebke Arendt, Christiane Lange, Janis Rabe und Maike Groenewold, vielen Dank für die nette Laboratmosphäre, die große Hilfsbereitschaft, die nützlichen Diskussionen, die entspannten Pausen und das gemeinsame Kochen. Simone vielen Dank Janis und Maike, danke für die Korrektur von weiten Teilen dieser Arbeit.

Dank auch an Simone Virus und allen weiteren am COR-Projekt beteiligten Studenten, Praktikanten und Hilfskräften. Florian, Sabine, Alexander, Pascal, und Theresa, danke schön.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Edward Reijerse von der Arbeitsgruppe „Bio Hydrogen“ am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim an der Ruhr für die Zusammenarbeit bei den EPR-Experimenten bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Beate Jaschok-Kentner für die N-terminale Sequenzierung.

Ebenso gilt mein Dank der Arbeitsgruppe Layer für die lehrreichen Freitagseminare und die Unterstützung darüber hinaus.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie möchte ich mich für die hilfsbereite und freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Danke auch an Bernd Hoppe, Christina

Nitzsche, Daniela Schnobel, Katharina Boronowski, Barbara Cwiklinski und Dagmar Rose.

Christiane, Janis, Maike, Conny, Mela, Julia A., Vera und Dagmar, vielen Dank für die Tipps, Gespräche und die tolle Zeit im Labor und außerhalb. Ohne euch wäre es nur halb so schön gewesen.

An dieser Stelle sei auch meiner Familie, meinen Freunden und meinen Nachbarn, die mich immer unterstützt haben, gedankt.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Sina. Papa und Mama, ihr habt mich jederzeit unterstützt und immer an mich geglaubt. Danke, dass ihr immer für mich da gewesen seid und ich mich immer auf euch verlassen kann